



UNIVERSITÁ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÁ DI MEDICINA E CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN FISIOLOGIA

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE BIO-09

CICLO XXIII

Tesi di Dottorato di Ricerca

Caratterizzazione molecolare attraverso analisi di immunofluorescenza
di cardiomiociti pacemaker derivati da cellule staminali embrionali
murine ingegnerizzate

Dottorando: Dott.ssa Nausicaa Mazzocchi

Matricola: R07719

Tutor: Prof. Mirko Baruscotti
Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie

Coordinatore: Prof. Paolo Cavallari

Anno Accademico 2009-2010

*Ai miei genitori,
a mia sorella
e ad Andrea*

Indice

<i>Introduzione</i>	<i>pag. 1</i>
<i>Il cuore e il sistema di conduzione</i>	<i>pag. 1</i>
<i>Struttura e funzione del cuore</i>	<i>pag. 1</i>
<i>Il sistema di conduzione cardiaco</i>	<i>pag. 2</i>
<i>La corrente If</i>	<i>pag. 4</i>
<i>Proprietà della corrente If</i>	<i>pag. 4</i>
<i>Modulazione autonoma della corrente If cardiaca</i>	<i>pag. 7</i>
<i>I canali HCN</i>	<i>pag. 8</i>
<i>Struttura e funzione dei canali HCN</i>	<i>pag. 8</i>
<i>Distribuzione dei canali HCN nel cuore</i>	<i>pag.10</i>
<i>Le cellule staminali</i>	<i>pag.11</i>
<i>Le cellule staminali embrionali</i>	<i>pag.12</i>
<i>Patologie cardiache e Pacemaker biologico</i>	<i>pag.15</i>
<i>Patologie a carico della generazione e conduzione dell'impulso elettrico</i>	<i>pag.15</i>
<i>Strategie per la creazione di un pacemaker biologico</i>	<i>pag.17</i>
<i>CD166</i>	<i>pag.21</i>
<i>Scopo del Lavoro</i>	<i>pag. 23</i>
<i>Materiali e Metodi</i>	<i>pag. 24</i>
<i>Plasmide pHCN4-EGFP</i>	<i>pag.24</i>
<i>Isolamento di miociti ventricolari neonatali di ratto</i>	<i>pag.27</i>
<i>Trasfezione di miociti</i>	<i>pag.28</i>
<i>Immunofluorescenza</i>	<i>pag.29</i>

<i>Microscopio Video-Confocale e acquisizione delle immagini</i>	<i>pag.33</i>
<i>Analisi dei dati di immunofluorescenza</i>	<i>pag.35</i>
<i>Risultati</i>	<i>pag. 37</i>
<i>Discussione</i>	<i>pag. 59</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>pag. 67</i>

Introduzione

Il cuore e il sistema di conduzione

Struttura e funzione del cuore

Il cuore è un organo cavo posto nella cavità toracica, costituito principalmente da tessuto muscolare striato, supportato da una struttura fibrosa detta pericardio. La parete del cuore è costituita da tre tuniche:

- *endocardio*, tappezza la cavità cardiaca ed è costituito da una sottile lamina connettivale rivestita, verso il lume, da cellule endoteliali. L'endocardio ha la funzione di favorire lo scorrimento del sangue all'interno del cuore per evitarne i coaguli;
- *miocardio*, formato da fibrocellule muscolari cardiache ordinatamente orientate in modo da permettere la corretta contrazione;
- *epicardio*, costituito da un sottile strato di connettivo lasso e contenente capillari sanguigni, capillari linfatici e fibre nervose.

Il cuore presenta quattro camere (**Fig.1**): l'atrio sinistro e destro ricevono rispettivamente il sangue dalla circolazione polmonare e sistemica, il quale passa poi nelle due camere inferiori, i ventricoli, che contraendosi, inviano il sangue a tutti i distretti corporei e ai polmoni.

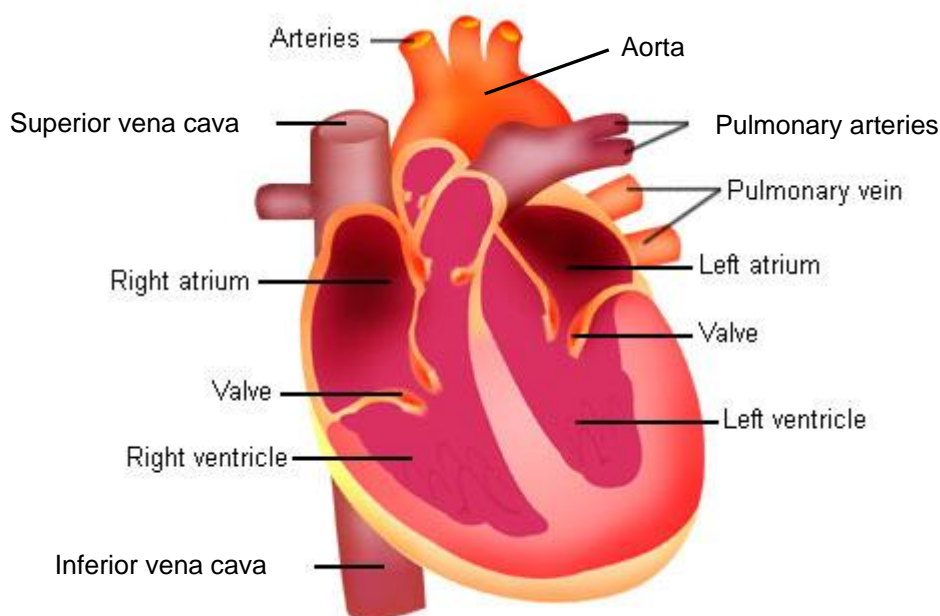


Fig.1. Rappresentazione di una sezione longitudinale del cuore umano.

La funzione contrattile degli atri serve a riempire al meglio i ventricoli che hanno la funzione di spingere il sangue nelle arterie per farlo arrivare in tutti i tessuti. E' quindi evidente che gli atri non dovranno sviluppare grandi pressioni per spingere il sangue nei ventricoli, mentre questi ultimi dovranno sviluppare pressioni molto alte, soprattutto a sinistra, per spingere il sangue in tutte le arterie. Da questa differente funzione deriva la diversità strutturale, infatti la muscolatura atriale è relativamente sottile rispetto alla muscolatura ventricolare che ha una consistenza ben diversa. Atri e ventricoli hanno una funzione distinta e un'attivazione in tempi diversi, non c'è continuità muscolare tra di essi ma sono tenuti uniti da una struttura fibrosa.

Il cuore è l'organo centrale dell'apparato circolatorio, funge da pompa capace di produrre una pressione sufficiente per permettere la circolazione del sangue. E' un organo autoritmico e quindi non necessita dell'innervazione per contrarsi. Infatti presenta un sistema di generazione e di conduzione dell'impulso che permette l'eccitazione prima degli atri e poi dei ventricoli, con modi, tempi e velocità opportuni, per permettere al cuore di svolgere correttamente la sua funzione di contrazione (sistole) e dilatazione (diastole).

Il sistema di conduzione cardiaco

Le cellule muscolari cardiache sono organizzate a formare un sincizio grazie alla presenza di estesi complessi giunzionali, detti *dischi* o *strie intercalari*, che ne connettono le estremità adiacenti. I complessi giunzionali, oltre che da desmosomi e *fasciae adhaerentes*, sono rappresentati anche da *gap junctions*, sede della propagazione dell'impulso elettrico da una fibra all'altra. L'insieme di queste giunzioni assicura la coesione elettrica e meccanica tra le fibre che compongono il miocardio per facilitare la propagazione dell'eccitamento. Dal punto di vista fisiologico e funzionale, è possibile suddividere il cuore in due distretti fondamentali: il *miocardio di lavoro* (*miocardio comune*), che sviluppa la forza contrattile del cuore, formato prevalentemente da cellule muscolari, e il *tessuto di conduzione* (*miocardio specifico*), responsabile della generazione e della conduzione dell'impulso nervoso a tutto il muscolo cardiaco. L'apparato di conduzione è un sistema specializzato che genera e regola la frequenza del battito cardiaco permettendo al cuore, in condizioni normali, di battere in maniera efficiente e ordinata.

Il sistema di conduzione del cuore (**Fig.2**) è formato da diverse parti:

- *Nodo senoatriale* (NSA), localizzato nel solco terminale della parete posteriore dell'atrio destro, sotto l'apertura della vena cava superiore. Questa regione è nota anche come *pacemaker naturale* del cuore in quanto è proprio in questo punto che si origina l'impulso elettrico. Il nodo senoatriale possiede la capacità di generare spontaneamente potenziali d'azione che si propagano al resto del tessuto di conduzione, agli atri e ai

ventricoli tramite giunzioni comunicanti (*gap junction*). Grazie a ciò il cuore è quindi in grado di contrarsi spontaneamente e ritmicamente senza bisogno di uno stimolo da parte del sistema nervoso centrale.

- *Vie internodali*, si tratta di una striscia di tessuto di conduzione che deve condurre il segnale verso il nodo atrioventricolare.
- *Nodo atrioventricolare* (NAV), situato nella parte posteriore destra del setto interatriale, è il principale responsabile del ritardo nel passaggio del segnale dagli atri ai ventricoli. Un'altra importante funzione del nodo atrioventricolare è quella di permettere il passaggio unidirezionale dell'impulso cardiaco, impedendone la propagazione dai ventricoli agli atri tramite uno strato fibroso che funziona da isolante. Rappresenta l'unico punto di continuità elettrica tra atri e ventricoli.
- *Fascio di His*, costituito da un complesso di fibre che dal nodo atrioventricolare si estende per un breve tratto nella parete membranosa del setto interatriale; qui si biforca in due branche: una verso il ventricolo destro e l'altra verso il ventricolo sinistro.
- I rami delle diverse branche risalgono verso la base dei ventricoli con fini diramazioni, denominate *fibre del Purkinje*, che propagano l'impulso alla massa cardiaca ventricolare. Le cellule che compongono le fibre del Purkinje possiedono una conducibilità maggiore rispetto ai cardiomiociti.

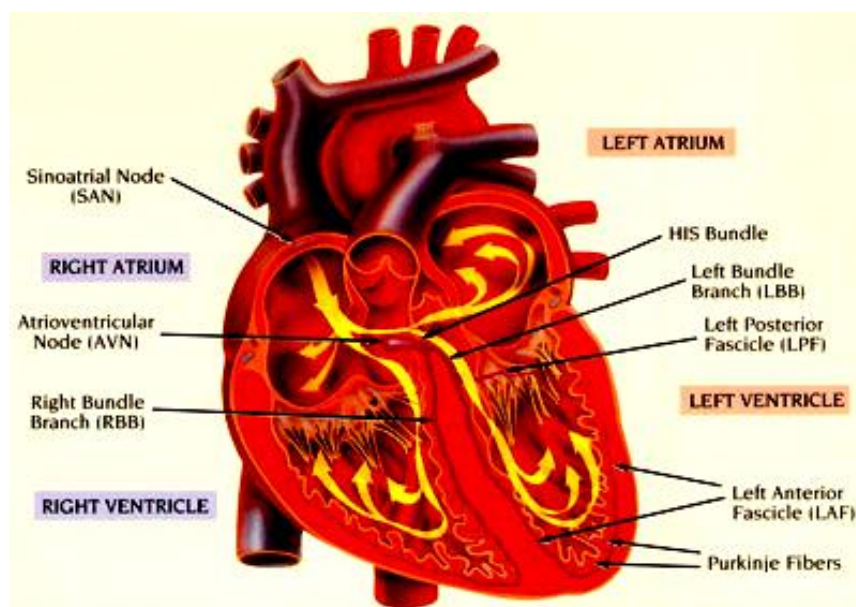


Fig.2. Schema del sistema di conduzione cardiaco in una sezione longitudinale del cuore umano. Le frecce gialle rappresentano il percorso dell'impulso elettrico.

La principale caratteristica del miocardio specifico consiste nella possibilità di generare autonomamente gli impulsi elettrici. Il ritmo di contrazione viene imposto dal nodo senoatriale e corrisponde nell'uomo ad una frequenza compresa fra 60 e 100 battiti al minuto. Nei casi in cui il NSA non è in grado di assolvere alla funzione di pacemaker, il cuore continua a battere, anche se a ritmi notevolmente inferiori (40/60 impulsi al minuto) e il ritmo che si impone è detto "non sinusale" perché ha origine al di fuori del nodo del seno. Ciò è possibile in quanto il NSA non è l'unica regione del cuore dotata di una propria capacità autoritmica, anche altri distretti del miocardio (nodo atrioventricolare e fibre del Purkinje) sono in grado di generare potenziali d'azione spontanei ma con una frequenza tanto minore quanto maggiore è la loro distanza dal NSA. L'attività di questi pacemaker "ausiliari", che è intrinsecamente più lenta, viene di norma oscurata da quella del NSA, ed emerge solo in condizioni patologiche. Questo fenomeno è noto come *overdrive suppression* ed è spiegato dal fatto che i miociti cardiaci, formando un sincizio funzionale, sono accoppiati elettricamente, per cui quelli dotati di una frequenza più elevata impongono il proprio ritmo. L'instaurarsi di un ritmo "non sinusale" rappresenta un meccanismo di protezione nelle patologie in cui la funzionalità del nodo senoatriale è compromessa.

Una volta che l'impulso si è generato nel nodo senoatriale si diffonde velocemente (1 m/s) in modo concentrico agli atri, provocandone la contrazione. A questo punto attraverso le fibre internodali, il segnale viene trasmesso al nodo atrioventricolare. È in questo punto del sistema di conduzione, quello che trasferisce il segnale dagli atri ai ventricoli, che l'onda di eccitazione subisce un leggero ritardo di trasmissione (circa 0,1 secondi). Questo ritardo è necessario affinché i ventricoli possano riempirsi completamente e la pompa cardiaca possa avere un perfetto rendimento. Poi l'impulso invade il fascio di His dove, attraverso le due branche, il segnale raggiunge le fibre del Purkinje le quali conducono rapidamente (2,4 m/s) l'impulso ai ventricoli che si contraggono.

La corrente I_f

Proprietà della corrente I_f

Le cellule del sistema di conduzione cardiaco e del miocardio di lavoro presentano potenziali di azione molto diversi tra loro, che ne riflettono le differenti funzioni e localizzazioni (**Fig.3**).

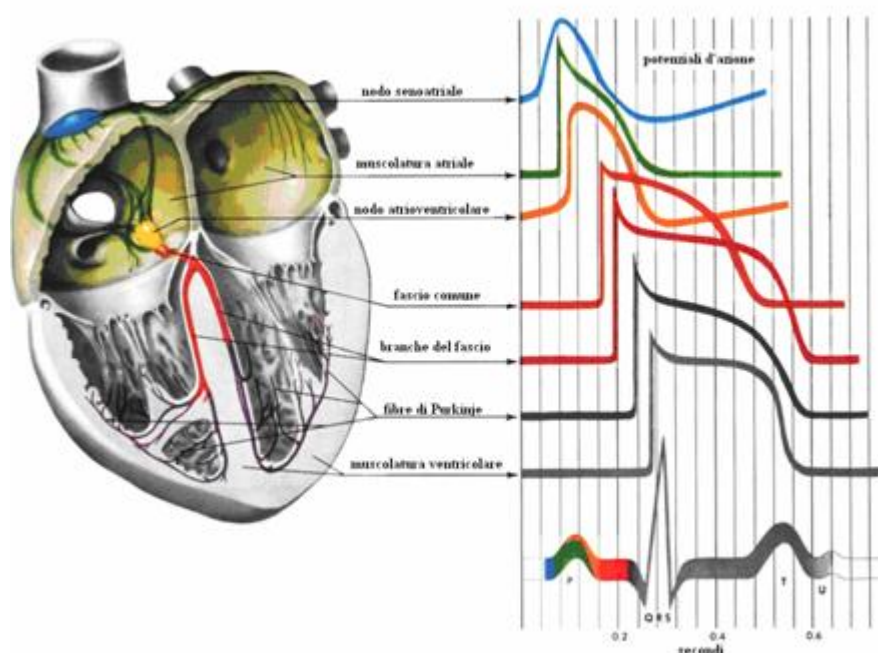


Fig.3. Rappresentazione schematica dei potenziali d'azione nei diversi distretti cardiaci.

In particolare, il potenziale d'azione delle cellule nodali (senoatriali e atrioventricolari) ha un andamento simile che differisce in modo significativo da quello delle restanti cellule cardiache. I miociti con attività autoritmica presentano infatti una *fase di depolarizzazione diastolica lenta* che conduce il potenziale di membrana verso il valore soglia per l'insorgenza di un nuovo potenziale d'azione (**Fig.4**).

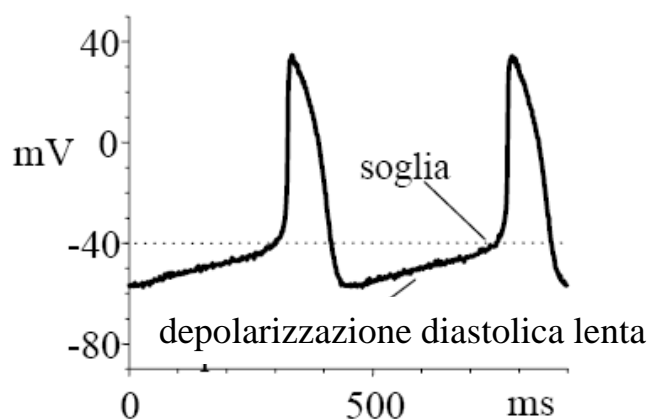


Fig.4. Attività spontanea registrata in una cellula isolata dal nodo senoatriale del cuore di coniglio. Il range di potenziale nel quale si sviluppa la fase di depolarizzazione diastolica lenta è compreso tra -40 mV e -60 mV.

La corrente chiave implicata nella generazione della fase di depolarizzazione diastolica lenta e nella modulazione di questa da parte dei neurotrasmettitori, è nota come corrente “pacemaker” o

“funny” (I_f) per le sue proprietà singolari (**Fig.5**). Una delle sue particolarità è quella di essere attivata in iperpolarizzazione. Si tratta di una corrente entrante mista di Na^+ e K^+ , tempo e voltaggio dipendente, modulata da mediatori adrenergici e muscarinici (DiFrancesco *et al.*, 1986). La soglia di potenziale alla quale la I_f inizia ad attivarsi è variabile e può essere compresa tra -35mV (DiFrancesco *et al.*, 1986) e -65 mV (Denyer *et al.*, 1990), ma normalmente si trova intorno ai -45 mV. Procedendo verso potenziali più iperpolarizzanti aumenta la quantità di corrente registrata e la velocità con cui la corrente si attiva.

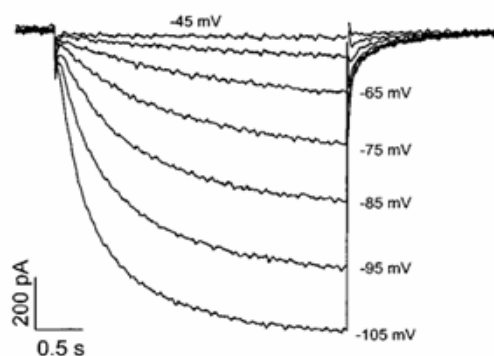


Fig.5. Tracce di corrente I_f registrate a -45, -65, -75, -85, -95, -105 mV partendo da un potenziale di riposo di -35 mV in miociti isolati dal NSA di coniglio (da Shi *et al.*, 1999).

Sebbene la corrente I_f svolga il ruolo fisiologicamente più importante a livello del nodo senoatriale, essa è presente anche in altre cellule del sistema di conduzione che sono in grado di generare potenziali d'azione spontanei a frequenza più bassa come i miociti atrioventricolari e le fibre del Purkinje (DiFrancesco, 1981). Durante lo sviluppo embrionale e neonatale del cuore, i canali responsabili della corrente I_f sono funzionalmente espressi anche nei miociti programmati per svilupparsi nelle cellule del miocardio di lavoro (miociti atriali e ventricolari). Tuttavia, negli stessi miociti adulti, non è evidente un ruolo fisiologico della I_f . Questo accade sia perché la densità dei canali è bassa, sia perché l'attivazione della corrente avviene a potenziali troppo negativi (-120/-150 mV) e quindi al di fuori dei potenziali fisiologici (Robinson *et al.*, 1997; Cerbai *et al.*, 1999). Di conseguenza, sia i miociti ventricolari che quelli atriali non sono dotati di attività autoritmica in condizioni normali. Correnti del tutto analoghe alla I_f sono state dimostrate anche in altri tessuti eccitabili come ad esempio nei neuroni di varie regioni del sistema nervoso centrale e nei fotocettori retinici; in queste regioni la corrente pacemaker viene

designata come I_h o I_q (Pape, 1996; Halliwell and Adams, 1982; Dekin, 1993; Seifert *et al.*, 1999; Demontis *et al.*, 2002; Moosmang *et al.*, 2001).

Modulazione autonoma della corrente I_f cardiaca

La frequenza cardiaca è sotto il controllo del sistema nervoso autonomo (cronotropismo) e risente principalmente dell'influenza del sistema nervoso simpatico e parasimpatico nel nodo senoatriale, in quanto sede di generazione dell'impulso e quindi sito di regolazione del battito cardiaco. Questa regione del cuore è densamente innervata e possiede recettori per i neurotrasmettitori e per gli ormoni che vengono rilasciati dal sistema autonomo. I neurotrasmettitori agiscono sulla I_f modulando la concentrazione citoplasmatica del secondo messaggero cAMP (nucleotide ciclico adenosin-monofosfato) (DiFrancesco, 1993). In particolare, l'interazione dei neurotrasmettitori del sistema simpatico con i recettori β -adrenergici media l'attivazione di G-proteins stimolatorie, mentre il legame degli agonisti del sistema parasimpatico con i recettori muscarinici promuove l'attivazione di G-proteins inibitorie. Le G-proteins attivate agiscono in ultima analisi sull'attività dell'adenilato ciclasi (AC), l'enzima responsabile della sintesi di cAMP, la quale aumenterà o diminuirà la produzione del secondo messaggero (**Fig.6**).

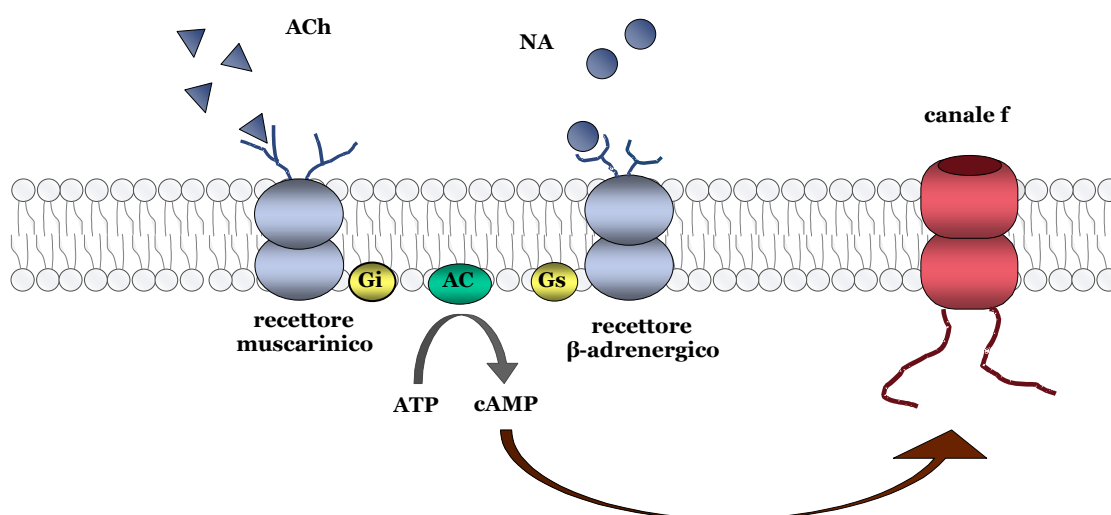


Fig.6. Modulazione del canale f da parte dell'AMP ciclico (cAMP); vie di trasduzione del segnale accoppiate al recettore β -adrenergico e al recettore muscarinico che determinano la variazione dei livelli di cAMP e, di conseguenza, la modulazione del canale pacemaker nei miociti senoatriali. ACh, acetilcolina; NA, noradrenalina; AC, adenilato-ciclasi; Gi, G-protein inibitoria; Gs, G-protein stimolatoria.

Un incremento dei livelli basali intracellulari di cAMP promuove l'interazione diretta del secondo messaggero con il canale f (DiFrancesco and Tortora, 1991) attraverso un meccanismo indipendente da processi fosforilativi. Questa molecola agisce sul canale f determinandone un aumento della probabilità di apertura senza modificarne la conduttanza (DiFrancesco and Mangoni, 1994). L'aumento di cAMP si traduce quindi in una maggiore probabilità di apertura dei canali pacemaker a parità di potenziale, al contrario, la diminuzione del secondo messaggero ne provoca una minore probabilità di apertura. Gli agonisti β -adrenergici provocano una maggiore quantità di corrente pacemaker in corrispondenza dei potenziali diastolici; ciò determina una maggiore pendenza della fase di depolarizzazione diastolica e quindi potenziali d'azione più frequenti (effetto cronotropo positivo) (DiFrancesco, 1993). Al contrario, gli agonisti muscarinici (acetilcolina o ACh) rilasciati dalle terminazioni vagali parasimpatiche, hanno effetto opposto: a potenziali diastolici la quantità di corrente pacemaker è minore e ciò porta ad una diminuzione della frequenza di contrazione (effetto cronotropo negativo) (DiFrancesco *et al.*, 1989).

I canali HCN

Struttura e funzione dei canali HCN

I costituenti molecolari dei canali f sono stati identificati verso la fine degli anni '90 in seguito alla clonazione dei geni codificanti (Santoro *et al.*, 1997; Santoro *et al.*, 1998; Gauss *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1998; Kaupp and Seifert, 2001). Per la loro caratteristica di essere attivati sia dal voltaggio che dai nucleotidi ciclici, tali canali sono stati denominati *Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels* (HCN). Nei vertebrati la famiglia dei canali HCN è composta da quattro membri (HCN1-4). Questi canali appartengono alla superfamiglia dei canali di K^+ voltaggio dipendenti (K_V) di cui condividono la struttura ed inoltre presentano omologia con i canali attivati dai nucleotidi ciclici (CNG) (Biel *et al.*, 1999; Kaupp and Seifert, 2001).

I canali HCN sono composti da sei segmenti transmembrana (S1-S6). Il segmento S4, carico positivamente, costituisce il sensore del voltaggio mentre i segmenti S5 e S6 e il loop di collegamento tra questi, formano il poro selettivo che presenta la tripletta GYG (glicina-tirosina-glicina) tipica dei canali permeabili al K^+ . A valle della sequenza GYG il canale presenta una serie di amminoacidi differenti rispetto ai canali di potassio (due residui carichi positivamente e un'istidina in più) che sono stati dimostrati essere responsabili dell'elevata permeabilità al Na^+

che lo contraddistingue (Kaupp and Seifert, 2001). Le regioni N- e C-terminale sono intracellulari (**Fig.7**).

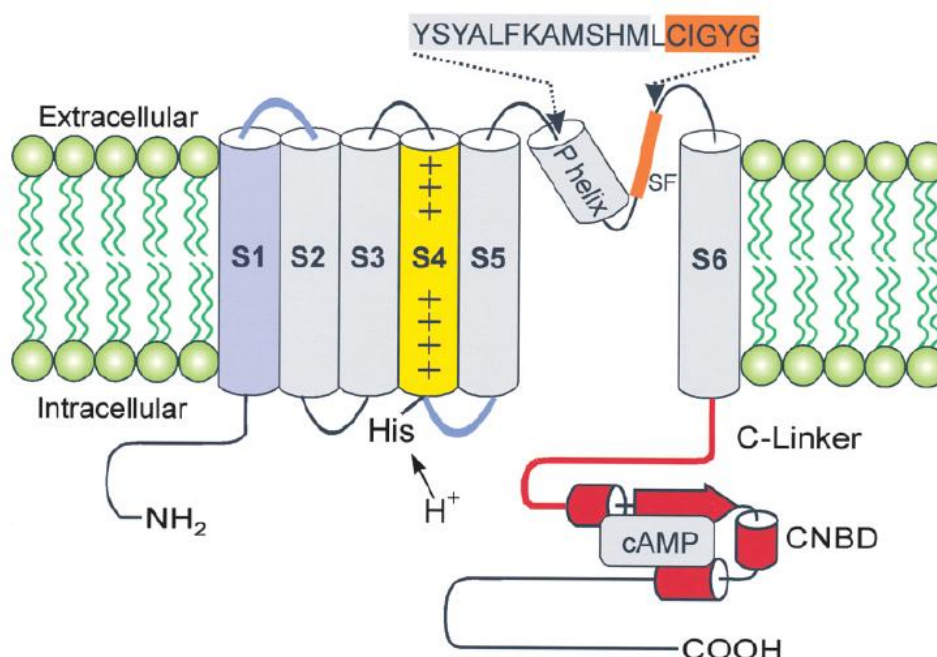


Fig.7. Struttura dei canali HCN. Rappresentazione di una singola subunità dei canali HCN. I 6 cilindri indicano i segmenti transmembrana; S4 è indicato come il sensore del voltaggio; i segmenti S5 e S6 e il loop tra questi come la regione del poro. A livello del C-terminale è indicato il sito di legame per i nucleotidi ciclici (CNBD) (da Biel *et al.*, 2002).

L'estremità C-terminale di tutti i canali HCN contiene il dominio di legame ai nucleotidi ciclici, CNBD (*cyclic nucleotide-binding domain*), il cui ruolo nella modulazione da parte del cAMP è stato ampiamente dimostrato (Viscomi *et al.*, 2001). La modulazione dei canali HCN avviene attraverso il legame diretto del nucleotide ciclico con il dominio CNB che provoca un aumento della probabilità di apertura del canale senza modificarne la conduttanza (Di Francesco and Mangoni, 1994). La regione *core* di questi canali, che è compresa tra il segmento S1 e il C-terminale del CNBD, è altamente conservata nella famiglia dei canali HCN (80-90% di omologia). Al contrario, le regioni N- e C-terminale variano considerevolmente in lunghezza e mostrano una debole omologia di sequenza. Analogamente ai canali di potassio voltaggio-dipendenti, si può ipotizzare che anche gli HCN adottino una struttura multimerica dove quattro subunità si assemblano a formare una proteina canale funzionale (tetramero) (Ulens and Tytgat, 2001; Chen *et al.*, 2001; Altomare *et al.*, 2003).

Distribuzione dei canali HCN nel cuore

Tecniche di Northern Blot, ibridazione *in situ*, RNase Protection Assay e immunolocalizzazione hanno permesso di determinare l'espressione tessuto-specifica delle quattro isoforme HCN (Santoro *et al.*, 1997; Ludwig *et al.*, 1998; Moosmang *et al.*, 1999; Seifert *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999; Demontis *et al.*, 2002). A livello cardiaco sono stati rilevati alti livelli dell'isoforma HCN2 nel ventricolo, moderati nell'atrio, bassi nel NSA (Shi *et al.*, 1999). L'isoforma HCN4 è senz'altro quella che presenta i più alti livelli di espressione nel nodo senoatriale (più dell'80% dell'mRNA totale dei canali HCN) e nelle fibre del Purkinje (Santoro *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 1999; Shi *et al.*, 1999; Moosmang *et al.*, 2001). Anche l'isoforma HCN1 è espressa nel nodo senoatriale, dove rappresenta più del 18% dell'mRNA totale dei canali HCN, e nelle fibre del Purkinje. Bassi livelli di HCN2 sono stati riscontrati anche nel nodo senoatriale di coniglio (Shi *et al.*, 1999). Si è sempre creduto che l'isoforma HCN3 non fosse presente nel cuore, invece dati recenti indicano che è espressa nel ventricolo di topo (Mistrik *et al.*, 2005). Questi dati suggeriscono che l'espressione di HCN4 è correlata a cellule spontaneamente autoritmiche presenti nel tessuto di conduzione, mentre l'espressione di HCN2 è sostanzialmente correlata a miociti non spontaneamente attivi. Ciò rispecchia i cambiamenti dell'espressione dei canali HCN nel cuore di topo durante lo sviluppo embrionale (Yasui *et al.*, 2001). Nei miociti ventricolari precoci che battono spontaneamente (9.5 giorni *postcoitum*) le isoforme dei canali HCN espresse in maniera predominante sono HCN4 e HCN1. Nei miociti embrionali più tardivi (da 18 giorni *postcoitum* a 1 anno prima della nascita), che nella maggior parte dei casi hanno perso la loro capacità di battere spontaneamente, HCN2 diventa la principale isoforma. Risultati analoghi sono stati precedentemente riscontrati nei miociti ventricolari neonatali e adulti di ratto (Shi *et al.*, 1999). Solo le isoforme HCN2 e HCN4 sono state rilevate in entrambe le tipologie di tessuto; mentre nei miociti neonatali HCN2 era espresso ad alti livelli (circa l'82% dell'mRNA totale dei canali HCN) e HCN4 era espresso a livelli molto più bassi (circa il 18% dell'mRNA totale dei canali HCN), nel ventricolo adulto di ratto questa percentuale cambiava risultando in un incremento dell'espressione di HCN2 (circa il 93% dell'mRNA totale dei canali HCN, HCN4 diventa circa il 6.8%).

Dato che nessuna delle quattro isoforme ricalca perfettamente le proprietà del canale nativo, non si esclude la possibilità che esso sia in realtà un eterotetramero. Recentemente sono stati condotti degli esperimenti nel nostro laboratorio nei quali si dimostra che le isoforme HCN1 e HCN4 contribuiscono entrambe alla corrente I_f nativa nelle cellule senoatriali, coassemblandosi in canali eterotetramerici. È stato confermato che le proprietà cinetiche e la sensibilità al cAMP di questi eterotetrameri sono intermedie tra quelle dei canali monomerici HCN1 e HCN4 ed è stato riscontrato che queste proprietà sono strettamente dipendenti dalla composizione delle subunità

dell'eterotetramero; nonostante gli eterotetrameri HCN4-1 presentino caratteristiche intermedie ai rispettivi omotetrameri, non riproducono completamente le proprietà dei canali f (Altomare *et al.*, 2003). Quanto detto sottolinea l'importanza del contesto intracellulare nella determinazione di alcune delle caratteristiche del canale come ad esempio la voltaggio dipendenza. La variabilità funzionale riscontrata nella corrente I_f nativa potrebbe derivare da un'eterogenea distribuzione tissutale delle diverse isoforme, da una diversa composizione eteromultimerica del canale, dalla presenza di subunità accessorie e/o, molto probabilmente, dall'interazione con il "microenvironment" citoplasmatico unico dei vari tipi cellulari (Barbuti *et al.*, 2004).

Le cellule staminali

Nel corpo umano esistono circa duecento tipi di cellule differenti con caratteristiche morfologiche, strutturali e funzionali molto diverse tra loro. Questa grande eterogeneità è dovuta essenzialmente alla necessità di svolgere compiti diversi e altamente specializzati all'interno dell'organismo. Tuttavia queste cellule presentano lo stesso patrimonio genetico e derivano da un'unica cellula progenitrice nata dalla fusione di un ovocita con uno spermatozoo. Nell'organismo adulto le cellule invecchiano e possono venire danneggiate, devono quindi essere sostituite. Lo sviluppo di tutti i tipi cellulari a partire dallo zigote e il mantenimento di una condizione di equilibrio cellulare nell'adulto, sono possibili grazie all'esistenza delle cellule staminali.

Oggi lo studio delle cellule staminali rappresenta uno dei settori di maggior interesse per quanto riguarda la ricerca in campo biomedico. Le loro capacità differenziative e rigenerative le rendono potenzialmente utilizzabili nella cura di svariate patologie di carattere degenerativo. Tuttavia, nonostante gli sforzi dei ricercatori, le reali potenzialità di queste cellule non sono ancora del tutto chiare.

Il termine "staminale" è utilizzato per definire una cellula indifferenziata in grado di dividersi, in modo asimmetrico, per periodi indefiniti (*long-term self renewal*) dando origine contemporaneamente ad altre cellule staminali e a cellule *precursori* di una progenie cellulare destinata a differenziarsi e a dare vita a tessuti e organi. In base alla capacità differenziativa le cellule staminali si possono dividere in quattro gruppi:

- *cellule staminali totipotenti*; possono generare tutte le cellule dell'organismo, comprese quelle che costituiscono i tessuti extra-embryonali come cellule della placenta e del cordone ombelicale. Solo lo zigote allo stadio di 4-8 cellule è totipotente;

- *cellule staminali pluripotenti*; possono generare tutti i tipi cellulari dell'organismo ma non i tessuti extra-embrionali;
- *cellule staminali multipotenti*; sono in grado di differenziarsi in diverse tipologie cellulari ma non possono generare un intero organismo;
- *cellule staminali unipotenti*; possono generare un solo tipo cellulare (un solo tipo di cellula specializzata).

Invece a seconda della provenienza, le cellule staminali si suddividono in due grandi gruppi: *cellule staminali embrionali* (*Embryonic Stem Cells* o ESCs) e *cellule staminali adulte* (*Adult Stem Cells* o ASCs). Ai fini di questo lavoro vengono prese in considerazione le cellule staminali embrionali.

Le cellule staminali embrionali

Le cellule staminali embrionali (ESCs) sono cellule pluripotenti, capaci quindi di generare tutti i differenti tipi cellulari presenti nell'organismo; sono cellule non specializzate ed in grado di replicarsi indefinitivamente, senza invecchiare. Inoltre sono manipolabili geneticamente. Nella maggior parte dei casi le ESCs sono ottenute da embrioni derivati da fecondazione *in vitro*. In particolare le cellule staminali embrionali sono ottenute dall'embrione quattro o cinque giorni dopo la fecondazione. A questo stadio l'embrione è una blastocisti costituita da tre strutture: il *trofoblasto*, strato cellulare protettivo esterno che circonda la blastocisti e che darà origine ai tessuti extra-embrionali di supporto (placenta e cordone ombelicale); il *blastocelo*, cavità interna alla blastocisti; e la *massa cellulare interna* (*Inner Cell Mass* o ICM), un gruppo costituito da circa trenta cellule e che si trova ad un estremo del blastocelo, destinato a differenziarsi per dare origine all'embrione (**Fig.8**).

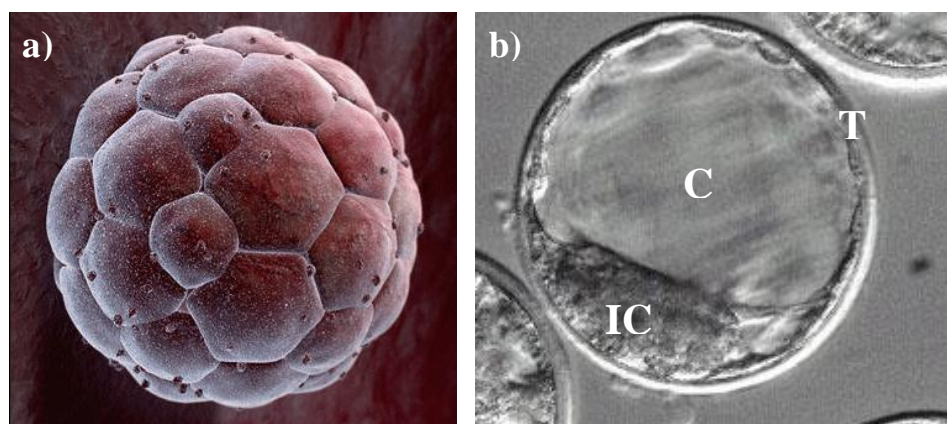


Fig.8. a) Immagine elaborata al computer della blastocisti umana. b) La blastocisti vista al microscopio elettronico; T, trofoblasto; C, blastocelo; ICM, inner cell mass.

Le cellule costituenti la ICM sono le cellule staminali embrionali. In seguito al processo della gastrulazione esse differenziano nei tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) che, a loro volta, danno origine a tutti i tessuti di un individuo adulto (**Fig.9**).

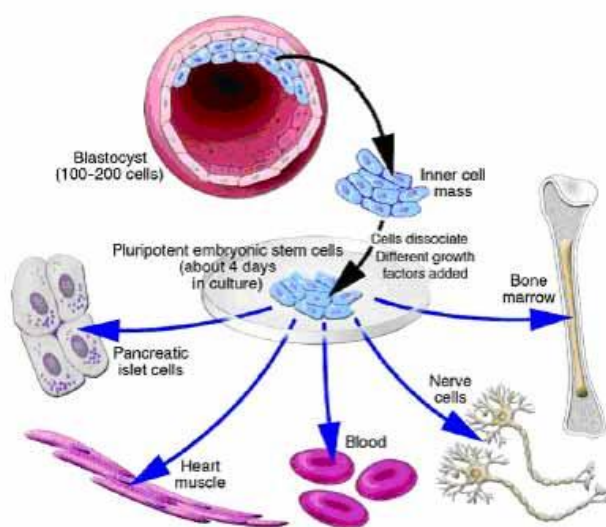


Fig.9. Rappresentazione schematica della capacità proliferativa e differenziativa delle cellule staminali embrionali isolate dalla massa cellulare interna (ICM).

Poichè le ESCs sono indifferenziate e sono in grado di proliferare indefinitamente, se coltivate *in vitro* in opportune condizioni, esse possono potenzialmente provvedere ad una illimitata fonte di cellule adulte specializzate.

Le prime linee di cellule staminali embrionali furono isolate nel 1981 da Evans e Martin, in modo indipendente, trasferendo cellule della Inner Cell Mass, derivate da blastocisti di topo, in colture contenenti *feeder cells* (fibroblasti murini utilizzati per fornire gli elementi necessari per il mantenimento della pluripotenza delle cellule staminali) (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Le colture risultanti contenevano popolazioni cellulari che crescevano come colonie, mostravano un'elevata capacità replicativa mantenendo la pluripotenza, ed erano capaci di differenziarsi in coltura in derivati dell'ectoderma, mesoderma ed endoderma. Le cellule staminali embrionali murine possono ora essere propagate *in vitro* sia attraverso l'uso di *feeder cells* sia aggiungendo in coltura il *fattore inibitore per la leucemia* (LIF: Leukemia Inhibitory Factor) (Williams *et al.*, 1988). Le cellule staminali embrionali murine sono commercialmente disponibili, esistono inoltre protocolli ben documentati e standardizzati che ne consentono la coltivazione e il differenziamento, senza trascurare il fatto che il loro utilizzo non è vincolato da problemi di carattere etico. Per questi motivi le cellule staminali embrionali di origine murina sono le più utilizzate nel campo della ricerca.

La scoperta di una tecnica per isolare e coltivare cellule staminali embrionali umane, avvenuta nel 1998, ad opera di un gruppo di biologi dell'Università di Madison, nel Wisconsin, guidato dal prof. Thomson, suscitò grande clamore (Thomson *et al.*, 1998). Gli scienziati riuscirono a produrre cinque linee staminali indipendenti usando 14 blastocisti ottenute da embrioni umani prodotti da fecondazione *in vitro*, donati perchè in sovrannumero. Queste linee cellulari erano in grado di proliferare a lungo senza differenziarsi e mantenevano la capacità di dare origine ad una varietà di specifici tipi cellulari quali cellule neuronali, muscolari e cartilaginee. Fin da subito si è compresa la grande potenzialità delle cellule staminali embrionali umane e si è aperta la prospettiva di un loro utilizzo clinico. Tuttavia esistono problemi sia tecnici che etici legati all'uso di queste cellule. Ad esempio, le cellule staminali isolate da embrioni non impiantati, come quelli ottenuti in eccesso durante procedure di fecondazione *in vitro*, potrebbero dare problemi di rigetto perchè potenzialmente immunogeniche se trapiantate in un paziente. Di conseguenza, ciò richiederebbe procedure di immunosoppressione simili a quelle utilizzate attualmente per i trapianti d'organo. Una possibile soluzione a questo problema è rappresentata dalla clonazione terapeutica. In breve, il materiale genomico di una cellula somatica del paziente è trasferito in un ovocita di una donatrice dopo che da questo è stato eliminato il pronucleo. In alcuni casi l'ovocita con il nuovo nucleo comincia a subire una serie di divisioni che lo portano allo stadio di blastocisti. Dalla ICM della blastocisti si possono isolare cellule staminali che hanno lo stesso genoma del paziente e che quindi non daranno problemi di rigetto.

Altri problemi riguardano sempre l'utilizzo delle cellule staminali embrionali *in vivo*: non si conosce ancora come controllare la loro crescita fuori dalla provetta ed evitare quindi che diventino cellule tumorali. Oltre ai problemi tecnici, l'utilizzo di cellule staminali embrionali umane solleva importanti questioni di carattere etico: l'estrazione di queste cellule richiede la soppressione dell'embrione che non supera mai i quattordici giorni dalla sua fecondazione.

Negli ultimi tempi le cellule staminali, in particolare la loro creazione e il loro impiego in medicina, sono diventate il tema scientifico più attuale: le ricerche e le scoperte si susseguono a ritmo sfrenato, occupando non solo le pagine delle riviste scientifiche specializzate ma anche quelle dei quotidiani o dei settimanali più popolari. Su questo tema si sollevano numerose polemiche: da una parte sulla capacità di queste cellule di curare malattie finora considerate inguaribili, dall'altra sulla moralità delle tecniche utilizzate per ottenerle.

In Italia la ricerca sulle cellule staminali embrionali è regolata dalla legge n. 40 del 19 febbraio del 2004, "Norme in materia di procreazione medicalmente assistita", che vieta qualunque sperimentazione condotta su embrioni umani e qualunque intervento di manipolazione che non sia finalizzato alla tutela della salute e dello sviluppo degli embrioni stessi. La legge non si pronuncia sulla sperimentazione condotta su staminali importate dall'estero o ricavate da

embrioni umani prima dell'entrata in vigore della legge in questione. L'Unione Europea non ha un regolamento comune riguardo la ricerca sulle cellule staminali embrionali umane. Ogni Stato ha leggi differenti. In Germania, come in Italia, è vietato l'utilizzo di embrioni soprannumerari per ricavarne cellule staminali, ma è consentita la ricerca su staminali importate da altri Paesi o su quelle ottenute prima che le leggi attuali entrassero in vigore.

Il protocollo di differenziamento *in vitro* delle mESCs utilizzato nel nostro laboratorio prevede la formazione di aggregati cellulari compatti, definiti *Embryoid Bodies* (EBs), attraverso la tecnica delle *hanging drops*, un protocollo ampiamente adoperato in letteratura (Wobus *et al.*, 1991; Maltsev *et al.*, 1993). Durante il differenziamento in EBs, alcune cellule della massa interna danno origine a componenti cellulari dell'ectoderma mentre altre formano l'endoderma ed il mesoderma. Dal settimo giorno di differenziamento (7+0) alcune regioni degli EBs presentano attività ritmica spontanea, segno che alcune cellule si sono differenziate in cardiomiociti pacemaker.

Patologie cardiache e Pacemaker biologico

Le malattie cardiache rappresentano uno dei maggiori problemi sanitari a livello mondiale e costituiscono la prima causa di morte nella popolazione dei paesi occidentali, compresa l'Italia, dove il 44% di tutte le morti è causato da malattie del sistema cardiocircolatorio. Nella definizione di malattie cardiovascolari rientrano tutte le patologie a carico del cuore e dei vasi sanguigni tra cui la cardiopatia ischemica, la cardiopatia ipertensiva, la pericardite, il prolasso della valvola mitrale e le aritmie. Per tutte queste patologie non esistono cure efficaci in grado di ripristinare il normale funzionamento cardiaco ed è quindi necessario sviluppare terapie alternative.

Patologie a carico della generazione e conduzione dell'impulso elettrico

A riposo un cuore normale batte dalle 60 alle 80 volte al minuto cioè circa 100.000 volte al giorno. Durante l'esercizio fisico o in condizioni di stress emotivo, il corpo necessita di una maggiore quantità di ossigeno e, per rispondere a queste richieste fisiologiche, deve pompare più sangue aumentando la sua frequenza di battito fino a oltre 100 volte al minuto.

La regolare generazione e trasmissione dell'impulso cardiaco può essere compromessa quando insorgono disfunzioni o alterazioni patologiche del ritmo (aritmie). Il sistema di conduzione cardiaco può non funzionare in modo corretto a causa di particolari condizioni quali il normale

processo di invecchiamento, eventi ischemici, malattie cardiache varie, disordini del sistema nervoso periferico. La gravità di queste disfunzioni può variare considerevolmente a seconda delle cause, dell'area di insorgenza e delle manifestazioni cliniche. Tali disfunzioni possono riguardare il nodo senoatriale, il nodo atrioventricolare o le normali vie di conduzione.

Per quanto riguarda il nodo del seno, gli impulsi che partono da esso possono essere troppo lenti (*bradycardia sinusale*), alternativamente troppo lenti o troppo veloci (*sindrome bradycardia tachycardia*) o possono saltuariamente mancare (*pausa sinusale*). A causa di questi problemi gli atri e/o i ventricoli si contraggono ad un ritmo troppo lento, con un numero di battiti al minuto inferiore a quanto sarebbe necessario. Nel caso di blocco totale, la frequenza di pulsazione dei ventricoli è data dalla frequenza intrinseca del nodo atrioventricolare e, qualora anch'esso presentasse un deficit, dalla frequenza intrinseca dei fasci che costituiscono il sistema di conduzione ventricolare. Di conseguenza nel caso di blocco completo, i ventricoli pulsano ad una frequenza minore (*bradycardia*). Se la frequenza cardiaca è eccessivamente bassa, si ha quella che viene definita *sindrome di Stokes-Adams*, che costituisce un serio problema che può mettere a repentaglio la vita stessa (la prognosi è di blocco completo e la sindrome di Stokes-Adams ha un indice di mortalità del 50% nell'arco di un anno). In questo caso l'impianto di un pacemaker artificiale è obbligatorio.

Un'altra condizione, conosciuta come *Sick Sinus Syndrome (SSS)* o sindrome del seno malato, costituisce un altro caso in cui l'impianto di un pacemaker artificiale è consigliabile. Questa patologia interessa il nodo senoatriale e comporta la presenza di frequenze cardiache inappropriate per le richieste fisiologiche dell'organismo. La SSS non ha un'unica eziologia e patogenesi, ma racchiude una serie di condizioni che alterano il tracciato elettrocardiografico, quali le bradiaritmie atriali, le tachiaritmie atriali, la tachycardia ventricolare oppure l'alternanza di bradycardia e tachycardia (Adan and Crown, 2003). In questo caso, la bradycardia deriva da una frequenza del nodo senoatriale eccessivamente bassa e quindi, anche in assenza di defezioni a livello del nodo atrioventricolare, i ventricoli pulsano ad una frequenza troppo bassa. Tipicamente si manifesta come una bradycardia sinusale o comunque una bradycardia non adeguata alle richieste fisiologiche (insufficienza cronotropa). Nei casi più gravi possono verificarsi arresti sinusali e blocchi senoatriali. La diagnosi viene solitamente effettuata con il solo ausilio dell'elettrocardiogramma. Il decorso della sindrome in assenza di terapia è discontinuo, con periodi di marcata disfunzione sinusale alternati a periodi di relativa normalità. La malattia del nodo del seno determina il 40-50% delle indicazioni all'impianto di pacemakers elettronici. Spesso queste patologie cardiache sono resistenti alle cure farmacologiche oppure possono essere soggette a trattamenti inadeguati: alcuni farmaci cardioattivi possono causare arresti sinusali periodici o blocchi senoatriali, altre sostanze possono peggiorare i sintomi della

SSS (Adan and Crown, 2003). L'unica terapia possibile in molti pazienti con questo tipo di patologia richiede l'impianto di un pacemaker elettronico, che contribuisce a diminuire l'incidenza di fibrillazione atriale, eventi tromboembolici, danno miocardico e arresto cardiaco. Un'altra patologia molto diffusa è il *blocco atrioventricolare* (BAV) in cui la conduzione dell'impulso elettrico attraverso il nodo atrioventricolare risulta rallentato o, in alcuni casi, bloccato. Le manifestazioni possono essere di varia gravità e vengono classificate in:

- *BAV di I grado* (o *blocco cardiaco incompleto*), quando il passaggio dell'impulso elettrico dagli atri ai ventricoli è solo rallentato ma il ciclo cardiaco rimane essenzialmente normale; non necessita di terapia;
- *BAV di II grado*, quando si verifica un blocco temporaneo del passaggio dell'impulso, ovvero un'interruzione intermittente nella conduzione degli impulsi dagli atri ai ventricoli; richiede l'impianto di un pacemaker;
- *BAV di III grado* (o *blocco atrioventricolare completo*), caratterizzato dal blocco completo della conduzione elettrica fra atrio e ventricolo. In questo caso un altro centro elettrico ausiliario genera un ritmo molto lento che assicura la sopravvivenza ma non consente di svolgere attività che richiedono al cuore un certo sforzo. Il BAV completo richiede l'impianto di un pacemaker.

Strategie per la creazione di un pacemaker biologico

Nella maggior parte di queste patologie l'impianto di un pacemaker elettronico è fortemente consigliato. I pacemaker elettronici hanno contribuito efficacemente a ridurre la mortalità associata a blocco cardiaco e, per molte patologie, rappresentano l'unica terapia valida ma presentano anche alcuni svantaggi. La limitazione maggiore è sicuramente la mancanza di una modulazione fine da parte del sistema nervoso autonomo e ormonale in risposta all'esercizio fisico, situazioni di stress o emozioni. Inoltre il pacemaker elettronico non rappresenta una cura definitiva, ha una durata limitata nel tempo e necessita di manutenzione periodica; in più l'interazione con alcuni strumenti elettronici, quali elettrostimolatori, metal detectors e apparecchi per la risonanza magnetica possono alterarne il corretto funzionamento. Le batterie hanno una durata limitata e richiedono la sostituzione ogni 5-10 anni; dal momento che sono sigillate all'interno del generatore, per sostituirle è necessario intervenire nuovamente in modo invasivo sul paziente. L'insorgenza di infezioni può richiedere talvolta la rimozione e la sostituzione del pacemaker elettronico.

Da alcuni anni la ricerca biomedica si è orientata verso la creazione di un pacemaker biologico in grado di generare un ritmo fisiologico stabile e di rispondere alla modulazione autonoma e

ormonale. Questo approccio terapeutico alternativo prevede lo sviluppo di un substrato cellulare in grado di generare o stimolare l'attività spontanea del miocardio.

Le strategie sviluppate per la creazione di un pacemaker biologico sono state fino ad oggi di due tipi: strategia genica e strategia cellulare. Il primo tipo di approccio si propone l'obiettivo di modificare le proprietà delle cellule già residenti nel miocardio in modo da incrementarne l'attività autoritmica intrinseca oppure generare attività spontanea in cellule normalmente quiescenti. Con la strategia cellulare, invece, si intende creare un pacemaker *ex novo* attraverso l'impianto di cellule staminali ingegnerizzate in modo da funzionare da generatori dell'impulso elettrico oppure differenziate verso un fenotipo dotato di capacità autoritmica.

Terapia genica

Il primo tentativo di risolvere problemi del ritmo attraverso la terapia genica è stato effettuato iniettando nell'atrio destro di cuori murini e di maiale un costrutto plasmidico contenente il gene del recettore β -adrenergico (Edelberg *et al.*, 1998; Edelberg *et al.*, 2001). In entrambe le specie l'over-espressione dei recettori β_2 -adrenergici, nella zona di iniezione, ha permesso di incrementare la sensibilità alla modulazione simpatica con un conseguente aumento del ritmo cardiaco basale di circa il 40-50%. Sebbene questi esperimenti dimostrano che il pacemaker biologico non è solo un concetto, ma una potenziale realtà, questo lavoro presenta diverse limitazioni, come la breve durata dell'effetto (solo 24 ore), l'uso di un vettore plasmidico e il fatto che sovraesprimendo i recettori β_2 -adrenergici viene modulata l'attività dei canali pacemaker pre-esistenti ma non ne vengono creati di nuovi. Attraverso questo approccio è quindi possibile modulare soltanto una funzione e non reintrodurla *ex novo*.

Ricerche successive sono state volte a modificare la fisiologia di cardiomiociti non autoritmici in modo da renderli capaci di generare un battito spontaneo. Per raggiungere questo obiettivo sono state sperimentate due vie alternative: la soppressione della corrente uscente iperpolarizzante IK_1 e la over-espressione di canali pacemaker. La prima strategia parte dall'idea che l'attività autoritmica atriale e ventricolare sono latenti e vengono soppressi dalla presenza della corrente IK_1 (famiglia Kir2), che stabilizza il potenziale di membrana a valori negativi (-75/-80 mV) e sopprime l'eccitabilità; per cui, spegnendo questa corrente si potrebbe "svelare" l'attività autoritmica. La soppressione di questa corrente è stata ottenuta producendo un costrutto contenente un gene kir 2.1 (subunità α accessoria del canale di potassio rettificatore entrante) mutato. Il gene con la mutazione (dominante negativo) codifica per una subunità α difettosa che, coassemblandosi con le altre subunità endogene, dà origine ad un canale non funzionale. Il dominante negativo, inserito con la proteina fluorescente GFP in un costrutto adenovirale, è stato iniettato nella camera ventricolare sinistra di cavie (Miake *et al.*, 2002). Gli esperimenti effettuati

confermano che 3-4 giorni dopo l'iniezione si è ottenuta una soppressione di IK_1 dell'80% nei miociti infettati dal costrutto adenovirale. Inoltre questi miociti, isolati dal cuore, mostrano potenziali d'azione spontanei. I principali problemi riguardano l'alterazione del ritmo cardiaco, per la formazione di foci ventricolari, e la comparsa di fenomeni aritmici letali dovuti al prolungamento della fase di ripolarizzazione (~15%). Inoltre, l'attività spontanea che si genera nei miociti ventricolari non è modulata direttamente dal sistema autonomico in quanto, in queste cellule, la principale componente ionica depolarizzante non è rappresentata dalla I_f ma dallo scambiatore Na^+/Ca^{2+} .

Prendendo atto di questi risultati gli esperimenti successivi si sono focalizzati sull'over-espressione di canali HCN, i componenti molecolari della corrente I_f . Questo approccio presuppone dei vantaggi in quanto la I_f è una tra le componenti ioniche determinanti nel processo di pacemaking ed è presente unicamente durante la diastole, quindi la sua sovraespressione non causa alterazioni delle altre fasi del potenziale d'azione, in più i canali HCN sono modulati direttamente dal sistema autonomico.

È stato dimostrato che l'over-espressione del gene HCN2 in colture di miociti ventricolari neonatali che presentano attività spontanea irregolare, è in grado di generare un ritmo stabile con potenziali d'azione caratterizzati da una fase di depolarizzazione diastolica lenta normalmente assente in questi preparati e aumentare la frequenza e la regolarità del battito (Qu *et al.*, 2001). Anche in questo caso è stato creato un costrutto adenovirale, contenente però il gene HCN2 accoppiato al gene per la proteina GFP. Il virus è stato iniettato nell'atrio sinistro e nella branca discendente sinistra del sistema del Purkinje di cani nei quali l'attività intrinseca del nodo del seno era stata soppressa tramite stimolazione vagale (Qu *et al.*, 2003; Plotnikov *et al.*, 2004). Gli animali trattati presentavano una sorgente di ritmo spontaneo nell'area dell'iniezione, modulabile tramite somministrazione di adrenalina. Un aspetto negativo di questa strategia è la formazione di ecchimosi e la creazione di un ritmo ectopico vicino al sito di iniezione per le prime 48 ore. Nonostante quest'ultima strategia sia stata l'unica in grado di originare un ritmo ventricolare stabile e modulabile da parte del sistema nervoso autonomico, l'utilizzo di un vettore virale e la durata limitata dell'infezione frena notevolmente la possibilità di applicazioni terapeutiche; inoltre l'utilizzo di virus come vettori non ha prospettive cliniche in quanto non si possono escludere con certezza casi di infettività o neoplasia.

Terapia cellulare

La terapia cellulare mira a creare pacemaker *ex novo* e prevede l'utilizzo di cellule staminali. Una delle strategie utilizzate consiste nel modificare geneticamente cellule staminali

mesenchimali umane adulte (hMSC) affinché esse esprimano i canali HCN necessari alla funzione di pacemaking (normalmente poco espressi nei miociti ventricolari quiescenti) per poi impiantarle nel miocardio. Dalla letteratura è noto che le cellule staminali mesenchimali esprimono endogenamente connessine cardiache (isoforme 40 e 43) (Valiunas *et al.*, 2004): questo garantirebbe la connessione elettrica tra le cellule staminali opportunamente ingegnerizzate ed i miociti residenti. Il pacemaker così ottenuto può essere definito passivo, in quanto la cellula staminale non è in grado di generare potenziali d'azione, ma fornisce solamente una fonte di corrente entrante depolarizzante che conduce il potenziale di membrana del miocita adiacente alla soglia per la genesi del potenziale d'azione. Il miocita ventricolare presenta un potenziale di riposo di -75 mV; grazie alla comunicazione elettrica garantita dalle *gap-junctions*, anche il potenziale di membrana della cellula staminale è trascinato verso valori negativi; nella cellula staminale a valori iperpolarizzati del potenziale di membrana si aprono i canali HCN, con conseguente ingresso di corrente depolarizzante; la membrana del miocita risente della depolarizzazione e raggiunge il valore soglia per la genesi del potenziale d'azione. Il pacemaker biologico passivo è stato sperimentato sul miocardio ventricolare di cani sottoposti a stimolazione vagale per sopprimere il ritmo sinusale. Gli animali trattati tramite l'impianto di cellule staminali modificate geneticamente presentavano un ritmo ventricolare con frequenza di 60 battiti al minuto, un valore significativamente maggiore rispetto ai non trattati (Potapova *et al.*, 2004). Il pacemaker passivo funziona e permette di eliminare l'utilizzo di vettori virali; inoltre non necessita del differenziamento della cellula staminale. Tuttavia anche questo tipo di pacemaker presenta delle limitazioni legate alla mancanza di modulazione da parte del sistema autonomo (a meno che non si introducano nella cellula staminale anche recettori adrenergici e muscarinici) e altri limiti legati all'utilizzo delle cellule staminali mesenchimali umane adulte riguardano la possibile insorgenza di neoplasie, la possibile migrazione di queste cellule in altri siti e il differenziamento in altri tipi cellulari.

La strategia ad oggi più promettente sembra essere la terapia cellulare applicata alla creazione di un substrato che non sia semplicemente un fornitore passivo di corrente necessaria al pacemaking ma che sia di per sé elettricamente attivo e modulabile, in modo da mimare il più possibile la situazione fisiologica. A questo scopo, recentemente, si è cercato di sfruttare le potenzialità differenziative delle cellule staminali con lo scopo di utilizzarle come fonte cellulare sostitutiva. Particolare attenzione è stata posta sull'uso di cellule staminali embrionali, in quanto possiedono un potenziale differenziativo intrinseco più elevato e si sono dimostrate più facilmente manipolabili rispetto alle staminali adulte. Ad oggi è stato dimostrato che le cellule staminali embrionali umane e murine possono essere indotte a differenziare *in vitro* in cardiomiociti autoritmici (Doetschman *et al.*, 1985; Wobus *et al.*, 1997; Kehat *et al.*, 2001).

Inoltre, le cellule così differenziate sono in grado di stimolare un substrato quiescente sia *in vitro* (Kehat *et al.*, 2004) che *in vivo* (Kehat *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005), funzionando quindi come un pacemaker. Le cellule staminali embrionali umane coltivate *in vitro* ed indotte a differenziare sono in grado di formare aggregati cellulari compatti, detti *Embryoid Bodies*, contenenti cellule contrattili. Dopo l'induzione di un blocco atrioventricolare, attraverso ablazione del fascio di His, le porzioni contrattili degli EBs sono state iniettate nella parete del ventricolo sinistro del cuore di maiale o di cavia. Dopo pochi giorni dal trapianto si è osservato un nuovo ritmo ventricolare stabile modulato dalle catecolamine (Kehat *et al.*, 2004; Xue *et al.*, 2005). In questo caso il pacemaker biologico si definisce attivo in quanto la cellula staminale differenziata in miocita autoritmico è capace di generare spontaneamente potenziali d'azione.

Il problema principale di questo tipo di strategia è di isolare una popolazione differenziata e omogenea che non contenga cellule immature che risulterebbero altamente teratogeniche (Rosen *et al.*, 2004). L'utilizzo di cellule staminali embrionali umane o murine per creare un pacemaker biologico sembra al momento la scelta più premiante, logica e promettente. Tuttavia, soprattutto per quanto riguarda l'utilizzo di staminali embrionali umane esistono problemi etici ed operativi ancora irrisolti.

CD166

Uno dei limiti che riguardano la creazione di un pacemaker biologico, utilizzando cellule staminali embrionali, è quello di riuscire a isolare una popolazione pura e omogenea di cellule differenziate verso il fenotipo cardiaco. L'isolamento dei cardiomiociti in generale, e in particolar modo quelli pacemaker, è reso difficile dalla loro bassa resa quantitativa (Metzger *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 2000; Kolossov *et al.*, 2005; Morikawa *et al.*, 2009) e dalla mancanza di antigeni extracellulari specifici ed esclusivi di queste cellule.

La proteina CD166, nota anche con il nome di ALCAM (*Activated Leukocytes Cell-Adhesion Molecule*), appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline ed è coinvolta nell'orientamento degli assoni, nell'ematopoiesi, nella risposta immunitaria e nella metastasi tumorale.

In letteratura è stato recentemente dimostrato che, durante l'embriogenesi, l'mRNA codificante per CD166 viene espresso nel *cardiac crescent* (posizione in cui si trovano i progenitori dei futuri tubi endocardici) e nella doccia neurale (*neural groove*) al giorno embrionale 7.75, mentre alti livelli di espressione sono presenti nel tubo cardiaco al giorno embrionale 8.5. L'espressione di CD166 viene persa nei cardiomiociti dal giorno embrionale 12.5; durante gli stadi di sviluppo più tardivi invece CD166 è presente in diversi organi (Hirata *et al.*, 2006). Durante i primi stadi di sviluppo del cuore embrionale, CD166 potrebbe quindi rappresentare un importante marker di superficie per i cardiomiociti. Studi successivi hanno dimostrato come nel sacco vitellino di topo,

le cellule positive per CD166 compaiono al giorno embrionale 8.5. In esse, quelle che presentano livelli di espressione più bassi di CD166, costituiscono la sottopopolazione dei precursori ematopoietici. Le cellule che esprimono CD166 a livelli maggiori rappresentano invece la sottopopolazione dei precursori sia endoteliali che cardiaci. Specificatamente in quest'ultima sottopopolazione, l'espressione di CD166 con il recettore di membrana flk-1 (o Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2) discrimina i precursori endoteliali da quelli cardiaci che ne risultano quindi sprovvisti (Murakami *et al.*, 2007).

In un altro studio condotto su ESCs umane selezionate al giorno 12 di differenziamento in base alla positività per CD166 e analizzate con tecniche di RT-qPCR, immunoistochimica e di metilazione del DNA, emerge la conferma che le cellule esprimenti ALCAM differenziano in una popolazione particolarmente arricchita in cardiomiociti (dotati sia di proteine contrattili che di canali ionici tipici delle cellule cardiache) ma vitali per un periodo di tempo limitato (Rust *et al.*, 2009).

La mancanza di antigeni di superficie specifici e tipici delle cellule cardiache/pacemaker è una grossa limitazione per quanto riguarda l'isolamento di una popolazione omogenea e differenziata di queste cellule. L'ingegnerizzazione di substrati cellulari a scopo terapeutico non è ben vista in campo clinico. Quindi la specifica e temporale espressione di CD166 nel cuore embrionale potrebbe rappresentare un importante strumento per l'identificazione e l'isolamento di cardiomiociti durante gli stadi precoci di differenziamento.

Scopo del Lavoro

Questo lavoro si inserisce in un più ampio progetto di ricerca volto alla creazione di un pacemaker biologico, cioè di un substrato cellulare autoritmico dotato di caratteristiche elettriche e molecolari quanto più possibile simili a quelle delle cellule senoatriali native.

Lo scopo di questo lavoro è incentrato sulla caratterizzazione molecolare, attraverso analisi di immunofluorescenza, di cellule pacemaker-like differenziate da cellule staminali embrionali murine (mESCs).

Per prima cosa abbiamo dimostrato la presenza di cardiomiociti pacemaker all'interno di EBs valutando i profili di espressione dei canali HCN e dei recettori responsabili della modulazione da parte degli agonisti autonomici, utilizzando come marker cardiaco/muscolare la caveolina 3.

La bassa resa quantitativa di cellule pacemaker-like e la mancanza di antigeni extracellulari tipici di queste cellule rendono complesso l'isolamento di una popolazione cellulare omogenea e differenziata. A questo proposito abbiamo ingegnerizzato le mESCs con il plasmide pHCN4-EGFP, in cui il gene reporter della EGFP si trova sotto il controllo trascrizionale di un promotore del gene HCN4. Le cellule EGFP positive all'interno degli EBs sono state caratterizzate per verificare le proprietà molecolari tipiche dei miociti pacemaker. Abbiamo quindi valutato l'espressione dei canali HCN4 nelle cellule EGFP positive e, per dimostrarne il differenziamento verso il fenotipo cardiaco, abbiamo verificato l'espressione di marcatori cardiaci/muscolari come l' α -actinina sarcomerica, la caveolina 3 e la connessina 43. L'ingegnerizzazione delle mESCs con il plasmide pHCN4-EGFP ha messo però in luce la presenza di cellule positive per la EGFP (e quindi con attivazione del promotore del gene HCN4) anche al di fuori delle porzioni contrattili degli EBs ottenuti dal loro differenziamento.

Recentemente è stato dimostrato come la proteina transmembrana CD166, specificatamente espressa nel tubo cardiaco di topo in sviluppo al giorno embrionale 8.5, possa essere usata come antigene di superficie per selezionare una popolazione cellulare arricchita in cardiomiociti. Abbiamo perciò valutato la natura cardiaca sia delle cellule CD166-positive che di quelle negative isolate da colture di mESCs ingegnerizzate al giorno 7+1 di differenziamento. In particolare sono stati eseguiti esperimenti di immunofluorescenza utilizzando anticorpi diretti contro l' α -actinina sarcomerica per analizzare la presenza di cardiomiociti, contro HCN4 e contro caveolina 3 per identificare e quantificare in maniera specifica le cellule con fenotipo pacemaker.

Materiali e Metodi

Plasmide pHCN4-EGFP

Per la costruzione del plasmide pHCN4-EGFP abbiamo clonato, da DNA genomico di topo, una regione altamente conservata di 2300 bp a monte dell'ATG iniziale del gene HCN4. Per il clonaggio abbiamo effettuato una PCR utilizzando i seguenti primers:

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Prodotto
Promotore HCN4	tggtggtgccccagcttttga	ggtgccaggaggattgggcc	2298 bp

Per la reazione di PCR è stata utilizzata la seguente mix:

DNA (50 ng/μl)	1 μl
Buffer <i>Pfu Ultra</i> (10X)	5 μl
dNTPs (8 mM)	6,3 μl
Primer Forward (25 μM)	1 μl
Primer Reverse (25 μM)	1 μl
<i>Pfu Ultra HotStart</i> DNA Pol.	1 μl (2.5 U)
DMSO 10% (v/v)	5 μl
Acqua MilliQ	Fino a 50 μl

Le condizioni di PCR utilizzate sono le seguenti:

95°C per 5 min.	1 ciclo
95°C per 30 sec.	30 cicli
44°-46°-48°C per 30 sec.	
72°C per 2 min.	
72°C per 10 min.	1 ciclo

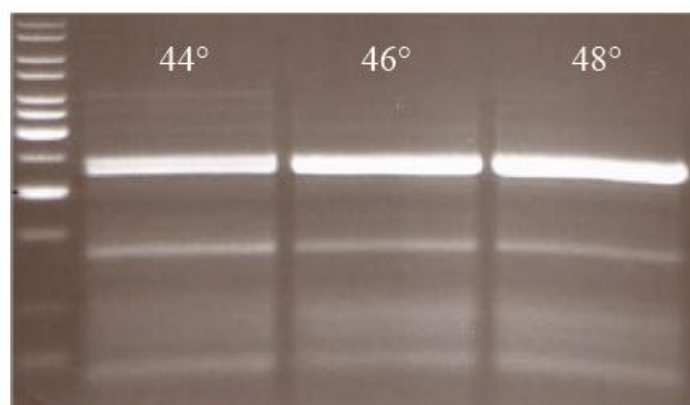


Fig.10. PCR con primers per il promotore del gene HCN4

Le bande ottenute sono di 2298 bp (**Fig.10**), la banda derivata dalla PCR effettuata con una temperatura di appaiamento dei primers di 48°C è stata tagliata ed estratta da gel (QIAquick Gel extraction kit, QIAGEN, seguendo il protocollo fornito dal kit). Il DNA è stato risospeso in 60 µl di H₂O MilliQ e, per assicurare la presenza di estremità piatte del DNA, questo è stato incubato con l'enzima Klenow (New England Biolabs) per 15 minuti a 25°C secondo la seguente reazione:

DNA (estratto da gel)	56 µl
NEB Buffer (10X)	7 µl
dNTPs (8 mM)	1,2 µl
Klenow	2 µl (10 U)
H₂O	3,8 µl
Volume Finale	70 µl

La Klenow è stata poi inattivata a 75°C per 20 minuti. Per ottenere la regione promotore d'interesse (pHCN4) il DNA è stato tagliato con l'enzima di restrizione SacI (New England Biolabs), che produce un frammento di 841 bp.

DNA (mix precedente)	70 µl
NEB Buffer 1 (10X)	1 µl
BSA (10X)	8 µl
SacI	1 µl (20 U)
Volume Finale	80 µl

La digestione è stata effettuata per 1 ora e 30 minuti a 37°C.

La banda di 841 bp, dimostrata essere la regione del promotore responsabile dell'attività trascrizionale di base del gene HCN4 (Kuratomi *et al.*, 2007), è stata quindi tagliata ed estratta da gel, il DNA è stato risospeso in 30 µl di H₂O MilliQ e quantificato.

Il promotore del gene HCN4 così ottenuto è stato subclonato nel plasmide pEGFP-N1 in cui era stato precedentemente eliminato il promotore costitutivo pCMV (pCMV-). Il Plasmide pEGFP-N1(pCMV-) è stato digerito utilizzando gli enzimi SacI e SmaI (New England Biolabs) che lasciano una estremità coesiva ed una piatta corrispondenti al frammento di PCR del pHCN4.

DNA (pHCN4-EGFP)	4 µl (1,5 µg)
NEB Buffer 4 (10X)	2 µl
BSA (10X)	2 µl
SmaI	1,5 µl (30 U)
H₂O	10,5 µl
Volume Finale	20 µl

Dopo la digestione con SmaI, per 1 ora e 30 minuti a 25°C, è stato aggiunto l'enzima SacI (1,5 µl, 30 Unità, New England Biolabs) ed è stata effettuata un'altra digestione per 1 ora e 30 minuti a 37°C. Il plasmide tagliato è stato estratto direttamente dalla soluzione di digestione ed è stata effettuata una reazione di ligazione con o senza (SELF) la banda pHCN4 per 2 ore a 25°C, con rapporto vettore/banda 1:5.

LIGAZIONE		SELF
1,8 µl	DNA vettore (27,6 ng/µl)	1,8 µl
4,5 µl	DNA banda (11,5 ng/µl)	/
2 µl	Buffer T4 (10X)	2 µl
1 µl (400 U)	T4 DNA ligase	1 µl (400 U)
10,7 µl	H₂O	15,2 µl
20 µl	Volume Finale	20 µl

Successivamente sono state trasformate le cellule competenti *E.Coli* XL1-Blue con il prodotto della ligazione pHCN4 + EGFP-N1(pCMV-) o con il prodotto della ligazione self come controllo negativo. Le colonie cresciute sono state amplificate in 5 mL di terreno LB 2% (w/v) + Kanamicina (50 µg/ml) overnight a 37°C in agitazione. Il giorno successivo il DNA è stato

estratto tramite MINI (Kit Nucleo Spin Plasmid, MN) e quantificato allo spettrofotometro. Sono state poi effettuate delle digestioni di controllo per verificare la correttezza del plasmide estratto. Il plasmide ottenuto (**Fig.11**) è stato successivamente sequenziato (MWG Bioscience).

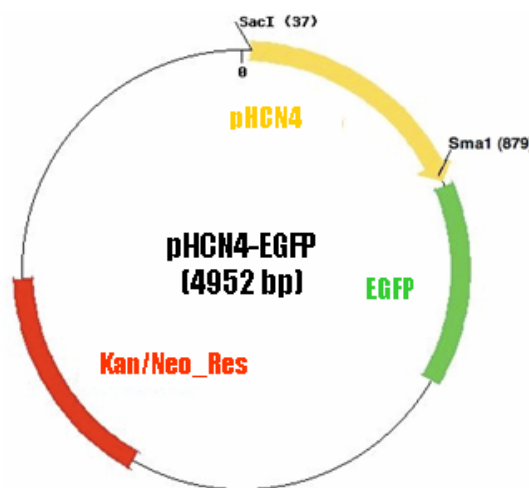


Fig.11. Rappresentazione schematica del plasmide pHCN4-EGFP con resistenza alla Neomicina.

Isolamento di miociti ventricolari neonatali di ratto

I miociti ventricolari neonatali (**Fig.12**) sono stati isolati da una nidiata di 12 ratti del ceppo CD di due-tre giorni (Charles River). Gli animali sono stati sacrificati, i cuori espunti e mantenuti in una soluzione fisiologica fredda (Phosphate Buffered Saline, PBS). I ventricoli sono stati isolati dal resto del cuore, sminuzzati e posti in una soluzione enzimatica così composta: ADS 1X (NaCl 116,4 mM; KCl 5,4 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 mM; MgSO_4 monoidrato 0,8 mM; Glucosio 5,5 mM; Hepes 20 mM; pH 7.4), Collagenasi I (136,8 U/ml, Whorthington) e Pancreatina (0,6 mg/ml, Sigma), e mantenuti in agitazione a 37°C per 20 minuti. Scartato il surnatante, è stata aggiunta altra soluzione enzimatica e ripetuta la fase di agitazione per altri 20 minuti a 37°C. Il surnatante della seconda digestione è stato quindi trasferito in una provetta contenente Fetal Bovine Serum (FBS) per inattivare gli enzimi e centrifugato a 310 x g per 5 minuti. Il pellet è stato risospeso in 1 ml di FBS e mantenuto in ghiaccio. L'operazione è stata ripetuta per 4 volte ottenendo così un volume finale di cellule ed FBS pari a 4 ml.

Per separare i cardiomiociti di nostro interesse dagli altri tipi cellulari presenti nel campione è stato preparato un gradiente di densità utilizzando due soluzioni, una per la fase superiore (Top:

Percoll Stock 45%, ADS 1X 55%) e una per la fase inferiore (Bottom: Percoll Stock 65%, ADS 1X 35%), a partire da una soluzione Stock costituita da Percoll al 90% e da ADS 10X al 10%.

La sospensione cellulare ottenuta dal processo di digestione enzimatica è stata distribuita sul gradiente e centrifugata a 1725 x g per 30 minuti senza freno per consentire la corretta distribuzione dei vari tipi cellulari all'interno del gradiente.

Questo procedimento ha determinato la formazione di tre distinte fasi: superiore, intermedia e inferiore, costituite, rispettivamente, da fibroblasti, cardiomiociti e globuli rossi. Dopo aver eliminato l'anello di fibroblasti, sono stati recuperati i cardiomiociti d'interesse e, dopo un lavaggio in ADS 1X, sono stati centrifugati a 310 x g per 5 minuti.

Il pellet così ottenuto è stato risospeso nel mezzo di coltura (Plating medium: DMEM e Medium 199 in rapporto 4:1, Horse Serum 10%, Fetal Bovine Serum 5%, L-Glutammina 2 mM, Penicillina 100 U/ml, Streptomicina 0,1 mg/ml), le cellule sono state contate con l'utilizzo del colorante Trypan Blue e con la camera di Burkner, e piastrate ad una concentrazione di 4×10^5 cellule/ml.

Dopo 24 ore il terreno è stato sostituito con quello di mantenimento (Maintenance Medium: DMEM e Medium 199 in rapporto 4:1, Horse Serum 5%, Fetal Bovine Serum 5%, L-Glutammina 2 mM, Penicillina 100 U/ml, Streptomicina 0,1 mg/ml, Citosina-arabinoside, detta Ara-C, 2,5 μ M).

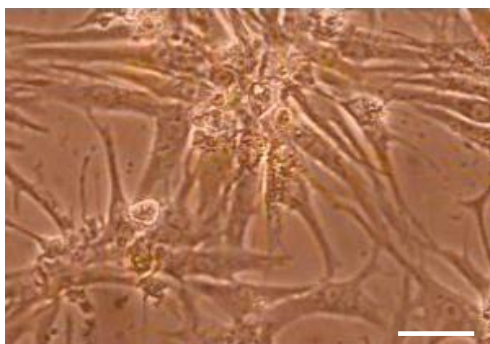


Fig.12. Immagine di una coltura di miociti ventricolari neonatali di ratto. Barra di calibrazione: 50 μ m.

Trasfezione di miociti

Il funzionamento del plasmide pHCN4-EGFP è stato verificato tramite una trasfezione di controllo in miociti ventricolari di ratto che esprimono, seppur a bassi livelli, la proteina HCN4

(Kuratomi *et al.*, 2007). La trasfezione è stata effettuata con Lipofectamina + Plus (Invitrogen), preparando le seguenti Mix:

Mix A (per Petri da 35 mm)	
Plus	3,8 µl
DNA plasmidico	0,5 µg
Optimem	Fino a 80 µl

La Mix A è stata incubata per 15 minuti a temperatura ambiente. Allo scadere dei primi 10 minuti di incubazione della Mix A è stata preparata la Mix B ed incubata per 5 minuti a temperatura ambiente.

Mix B (per Petri da 35 mm)	
Lipofectamina	3,8 µl
Optimem	76,2 µl

Successivamente la mix A e la Mix B sono state unite e incubate per 15 minuti a temperatura ambiente. In questo lasso di tempo le piastre di miociti sono state sciacquate due volte con Optimem (Invitrogen), al termine dei lavaggi vengono aggiunti nelle piastre 900 µl di Optimem e 160 µl di Mix A+B.

Le piastre vengono poi incubate per 6-8 ore a 37°C e 5% CO₂. Alla fine dell'incubazione viene cambiato il terreno alle piastre per sostituire la miscela di trasfezione con il normale medium di mantenimento. Prima dell'analisi al microscopio a fluorescenza, i miociti trasfettati sono state mantenuti per circa 2-3 giorni a 37°C e 5% CO₂ in modo da consentire la trascrizione e la traduzione del DNA plasmidico.

Lo stesso procedimento è stato eseguito per i plasmidi pCMV-EGFP (controllo positivo) e pCMV(-)-EGFP.

Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza è una tecnica di indagine molecolare che utilizza anticorpi rivolti contro un particolare antigene proteico. Questa tecnica permette così di valutare la presenza o assenza di proteine di interesse e la loro localizzazione.

Per le analisi di immunofluorescenza si utilizzano anticorpi coniugati a fluorocromi grazie ai quali le proteine di interesse vengono rilevate dall'osservatore. I fluorocromi sono molecole in grado di assorbire radiazioni elettromagnetiche di una certa lunghezza d'onda e di emettere una frazione dell'energia assorbita come radiazione elettromagnetica a lunghezza d'onda superiore. La frazione di energia assorbita che viene emessa dai fluorocromi viene detta fluorescenza.

Esistono principalmente due metodi per quanto riguarda la marcatura del campione con anticorpi: il metodo diretto, dove l'anticorpo che riconosce la proteina d'interesse è direttamente coniugato ad un fluorocromo, e il metodo indiretto, nel quale vengono utilizzati due diversi tipi di anticorpi: un anticorpo primario rivolto contro la molecola di interesse ed un anticorpo secondario, che riconosce l'anticorpo primario, al quale è coniugato il fluorocromo. Il metodo indiretto viene usato per amplificare il segnale in quanto più molecole di anticorpo secondario (quindi più fluorocromi) legano diversi epitopi dell'anticorpo primario.

Per l'analisi di immunofluorescenza abbiamo utilizzato il metodo indiretto e la marcatura è stata eseguita sia sugli EBs sia sulle singole cellule ottenute dal differenziamento delle mESCs ingegnerizzate e non.

Il protocollo utilizzato prevede due sciacqui dei campioni con PBS, dopo aver eliminato il terreno di coltura. In seguito si effettua una fissazione chimica del campione allo scopo di preservarlo e stabilizzarlo mantenendone inalterata la struttura. Per gli EBs si utilizza paraformaldeide al 4% (Sigma) che viene lasciata sui campioni per 30 minuti in ghiaccio, mentre le singole cellule vengono fissate con paraformaldeide 2% (Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente. Con questo passaggio le cellule vengono protette da danni osmotici e si impedisce la solubilizzazione dell'antigene, mantenendolo nella posizione originaria e rendendolo accessibile all'anticorpo primario.

Viene effettuato un ulteriore sciacquo in PBS, per eliminare eventuali residui di fissativo, a cui seguono due lavaggi da dieci minuti ciascuno con una soluzione di PBS + Glicina 0.1M (Sigma), per inattivare i gruppi aldeidici liberi del fissativo ed eliminare l'autofluorescenza dovuta alla paraformaldeide. Si procede successivamente con la permeabilizzazione della membrana con TRITON X-100, un detergente blando. Per gli EBs la soluzione utilizzata è composta da PBS + TRITON X-100 1,5% (Sigma) che viene lasciata per 35 minuti a temperatura ambiente.

Dopo la permeabilizzazione il campione subisce il blocco dei siti aspecifici. Per gli EBs si utilizza una soluzione di PBS + BSA 1% (Sigma) + TRITON X-100 0,3% (Sigma) + SERUM 10% per un'ora a temperatura ambiente. Per quanto riguarda le singole cellule, i passaggi di permeabilizzazione e di blocco vengono effettuati insieme con una soluzione di PBS + BSA 1% (Sigma) + TRITON X-100 0,3% (Sigma) + SERUM 10% (Sigma) per 15 minuti a temperatura ambiente. È importante bloccare i siti aspecifici ai quali gli anticorpi primari e secondari possono

legarsi mediante interazioni idrofobiche, in quanto si potrebbero ottenere falsi segnali. Per bloccare i siti aspecifici dell'anticorpo primario si usano solitamente soluzioni ad elevato contenuto proteico, in questo caso si utilizza la BSA (Bovine Serum Albumin), mentre per bloccare i siti aspecifici dell'anticorpo secondario si usa il siero pre-immune dell'animale in cui è stato prodotto l'anticorpo secondario.

In seguito si procede con l'incubazione con anticorpo primario diluito in una soluzione composta da PBS + BSA 1% (Sigma) + TRITON X-100 0.1% (Sigma) + SERUM 2% (Sigma) per gli EBs, mentre composta da PBS + BSA 1% (Sigma) + SERUM 2% (Sigma) per le singole cellule. L'incubazione avviene overnight, in camera fredda (4°C) e i campioni sono tenuti in una camera umida per evitare un'eventuale disidratazione.

Passata la notte si procede con tre lavaggi in PBS da dieci minuti l'uno per eliminare l'anticorpo primario in eccesso; in seguito viene effettuata l'incubazione con l'anticorpo secondario diluito in una soluzione composta da PBS + BSA 1% (Sigma) + TRITON X-100 0.1% (Sigma) + SERUM 2% (Sigma) per gli EBs, mentre composta da PBS + BSA 1% (Sigma) + SERUM 2% (Sigma) per le singole cellule. L'incubazione con l'anticorpo secondario viene effettuata per un'ora, a temperatura ambiente, al buio e in camera umida.

Si elimina l'anticorpo secondario in eccesso con tre lavaggi in PBS da dieci minuti l'uno, in seguito si montano sulle piastrine i vetrini coprioggetto utilizzando il montante Vectashield Mounting Medium for fluorescence (Vector) contenente glicerolo e DAPI, un intercalante fluorescente del DNA che permette di evidenziare i nuclei.

Sono stati eseguiti anche esperimenti di controllo in cui sono stati omessi gli anticorpi primari in modo da testare la specificità degli anticorpi secondari. Inoltre sono stati eseguiti esperimenti di controllo di preassorbimento solo per l'anticorpo anti-HCN4 poichè abbiamo considerato questo canale come marker principale delle cellule pacemaker-like. In questi esperimenti di preassorbimento l'anticorpo anti-HCN4 viene incubato con un eccesso del suo antigene prima dell'aggiunta nel campione in modo da valutare la specificità dell'anticorpo primario.

In tutti gli esperimenti di controllo condotti nessun segnale di fluorescenza è stato rilevato.

Tabella 1: anticorpi primari e diluizioni

Anticorpo primario	Diluizione	Ditta produttrice
Rabbit anti-HCN1 (policlonale)	1:100	Alomone labs
Goat anti-HCN1 (policlonale)	1:100	Santa Cruz
Rabbit anti-HCN2 (policlonale)	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN3 (policlonale)	1:100	Alomone labs
Rabbit anti-HCN4 (policlonale)	1:100	Alomone labs
Goat anti-HCN4 (policlonale)	1:100	di nostra produzione
Mouse anti-caveolin 3 (monoclonale)	1:500	BD Biosciences
Rabbit anti- β_1 -adrenergic receptors (policlonale)	1:50	Santa Cruz
Rabbit anti- β_2 -adrenergic receptors (policlonale)	1:50	Santa Cruz
Rabbit anti-muscarinic M2 receptors (policlonale)	1:50	Santa Cruz
Chicken anti-GFP (policlonale)	1:1500	Abcam
Mouse anti- α -actinin (monoclonale)	1:700	Sigma
Mouse anti-connexin 43 (monoclonale)	1:50	Chemicon

Tabella 2: anticorpi secondari e diluizioni

Anticorpo secondario	Fluorocromo coniugato	Diluizione	Ditta produttrice
Donkey anti-rabbit	Alexa Fluor 594	1:1000	Molecular Probes
Donkey anti-rabbit	Alexa Fluor 488	1:1000	Molecular Probes
Goat anti-rabbit	Alexa Fluor 405	1:500	Molecular Probes
Donkey anti-goat	Alexa Fluor 594	1:1000	Molecular Probes
Donkey anti-goat	Alexa Fluor 488	1:1000	Molecular Probes
Donkey anti-mouse	Alexa Fluor 594	1:1000	Molecular Probes
Donkey anti-mouse	Alexa Fluor 488	1:1000	Molecular Probes
Goat anti-chicken	Alexa Fluor 488	1:1000	Molecular Probes

Microscopio video-confocale (ViCo) e acquisizione delle immagini

Per l'acquisizione delle immagini è stato usato un microscopio ottico Video-Confocale (ViCo, Nikon) ed il relativo software Image-Pro Plus 6.0.

Questo sistema si basa su una tecnica recentemente sviluppata e denominata Microscopia Video-

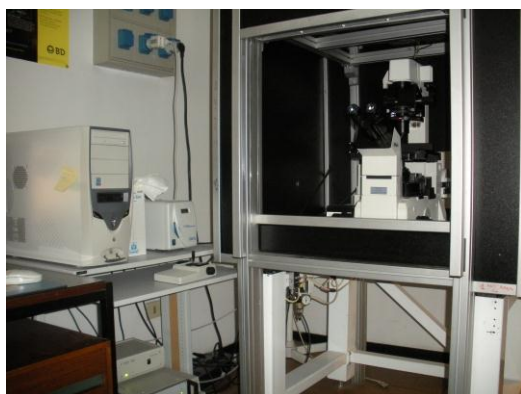


Fig.13. Il microscopio Video Confocale.

Confocale (VCM). Una delle proprietà più importanti della tecnica VCM è la modalità di illuminazione multi-puntuale, che si contrappone a quella dei microscopi confocali correntemente in uso, basati sui metodi di illuminazione mono-puntuale e quindi necessariamente legati all'uso di sorgenti laser.

ViCo (**Fig.13**) è un microscopio ottico di nuovo tipo che riassume in sé le capacità operative tipiche del microscopio ottico convenzionale, di quello assistito da telecamera e di quello confocale.

Questo microscopio utilizza una sorgente luminosa convenzionale (lampada ad arco Xenon) in modo tale da limitare i costi di acquisizione e gestione, che invece verrebbero richiesti con una fonte laser.

La luce bianca emessa dalla lampada è costituita da tutte le lunghezze d'onda della luce, e viene filtrata da un filtro di eccitazione, che seleziona una gamma ristretta di lunghezze d'onda di interesse. La radiazione selezionata viene convogliata sul campione dopo essere stata riflessa da uno specchio dicroico. Lo specchio dicroico è un filtro di vetro ricoperto da un sottilissimo film di alluminio (o fluoruro di calcio o fluoruro di magnesio) il quale consente di riflettere raggi con una certa lunghezza d'onda e di lasciar passare inalterati raggi con lunghezza d'onda maggiore. La radiazione emessa dal campione attraversa poi lo specchio dicroico e viene raccolta dall'obiettivo (o dal sensore di immagini CCD) dopo essere passata attraverso un filtro di emissione (o filtro di sbarramento) che seleziona un ristretto range di lunghezze d'onda emesse in seguito all'eccitazione dei fluorocromi.

Nel nostro microscopio è possibile selezionare, tramite il software, tre diversi canali con cui analizzare il campione a cui sono collegati tre combinazioni di filtri per l'eccitazione (a 345 nm, a 495 nm e a 547 nm). In questo modo ogni canale è dedicato ad eccitare un fluorocromo diverso e a selezionare la fluorescenza emessa evitando interferenze.

La caratteristica principale del metodo VCM è la presenza, lungo il cammino ottico di illuminazione tra il filtro di eccitazione e il campione, di un dispositivo (griglia) per la modulazione spaziale del fascio di luce. Con esso si realizza l'illuminazione multi-puntuale e a campo-ristretto del campione. La griglia, costituita da tanti fori di uguali dimensioni, ha lo scopo di dividere la radiazione luminosa in tanti fasci il più possibile unidirezionali, in modo che questi raggiungano il campione perpendicolarmente. Una luce unidirezionale garantisce una maggiore qualità dell'immagine, la griglia infatti tenta di rendere la luce incidente proveniente dalla lampada simile a quella di un raggio laser.

La griglia è motorizzata ed è in grado di spostarsi nello spazio lungo le tre dimensioni (x, y e z). Lo spostamento della griglia lungo gli assi x e y è necessario in quanto la griglia suddivide il campione in tante cellette lasciando passare la radiazione luminosa solo attraverso i fori. Per ottenere un'immagine completa, tutta l'area di interesse del campione deve essere colpita dalla luce di eccitazione. Ciò avviene grazie allo spostamento della griglia di un numero di step forniti dallo sperimentatore tramite il software.

Lo spostamento della griglia lungo l'asse z invece consente di acquisire diverse sezioni lungo lo spessore del campione. Infatti, spostando il fuoco dell'obiettivo, è possibile impostare nel software un piano focale di inizio e uno di fine. Tra questi due piani il software calcola due parametri: il numero di sezioni e il loro spessore. Lo sperimentatore può decidere di impostare

uno dei due parametri mentre l'altro verrà calcolato automaticamente. Prima di acquisire diverse sezioni del campione è necessario regolare anche il fuoco della griglia sui piani focali di inizio e fine impostati precedentemente. In questo modo sul campione illuminato vengono messi a fuoco i fori della griglia mediante il suo spostamento lungo l'asse z.

È possibile scegliere anche tra vari modelli di griglie con grandezza e interasse dei fori diversi, in base alle esigenze e alle caratteristiche del campione. Se l'apertura del foro è piccola si ottiene una maggiore risoluzione spaziale, se l'apertura è grande si avrà una maggiore illuminazione del campione. Per quanto riguarda l'interasse, se la distanza dei fori è piccola l'analisi del campione risulterà più rapida, mentre una distanza più ampia fornisce un maggior contrasto in preparati spessi e densi. Solitamente si sceglie una griglia che abbia un buon compromesso tra rapidità di analisi e buona risoluzione spaziale.

Prima di acquisire un'immagine è necessario impostare anche i valori di altri parametri come integrazione, guadagno e offset che riguardano il sistema di rilevamento del segnale (CCD). L'integrazione è il tempo in cui la telecamera rimane aperta per captare la fluorescenza del campione durante uno step della griglia; più è intenso il segnale della fluorescenza più l'integrazione sarà bassa. Gain e offset invece regolano rispettivamente il guadagno e il contrasto della camera prima della conversione del segnale da analogico a digitale.

Durante l'acquisizione, per ogni canale, la griglia esegue il numero di spostamenti lungo l'asse x e y forniti dallo sperimentatore, e ciò viene ripetuto per ogni sezione impostata del campione. Il programma di acquisizione elabora tutta la serie di immagini che la telecamera ha raccolto fornendo un unico output che mostra le diverse sezioni del campione prese in esame.

Analisi dei dati di immunofluorescenza

Per l'analisi statistica, le immagini di immunofluorescenza sono state acquisite per entrambe le sottopopolazioni CD166+ e CD166- in coltura dai tre ai tredici giorni dopo il sorting. Le acquisizioni all'ingrandimento 20X sono state realizzate al fine di valutare e quantificare la presenza di cardiomiociti utilizzando come marker muscolare/cardiaco l' α -actinina. Per quantificare il numero di cardiomiociti abbiamo contato le cellule positive per l' α -actinina prendendo in considerazione 4 campi ad ingrandimento 20X per ogni vetrino allestito.

Le acquisizioni all'ingrandimento 40X sono state eseguite per verificare e quantificare la presenza di cellule con fenotipo pacemaker nella popolazione di cardiomiociti, utilizzando anticorpi diretti contro il canale HCN4 (marker distintivo delle cellule pacemaker) e diretti

contro l' α -actinina (marker muscolare/cardiaco). La statistica è stata condotta contando il numero delle cellule HCN4 positive su quelle che mostravano marcatura per l' α -actinina. Per ogni vetrino allestito abbiamo preso in considerazione dai 4 ai 15 campi ad ingrandimento 40X. In tutti gli esperimenti, le differenze statistiche sono state determinate mediante il test t di Student per popolazioni indipendenti e i dati ottenuti, espressi come valore medio \pm media degli errori standard (S.E.M, Standard Error of the Mean) sono stati rappresentati nei rispettivi istogrammi; è stato inoltre specificato il numero dei campioni analizzati (N) e utilizzati nella statistica. Il livello di significatività statistica è stato fissato a $P=0.05$.

Risultati

E' noto che le ESCs sono in grado di differenziare spontaneamente in miociti cardiaci con proprietà elettriche tipiche del miocardio di lavoro e del sistema di conduzione (Maltsev *et al.*, 1993; Maltsev *et al.*, 1994; Hescheler *et al.*, 1997). Per caratterizzare le proprietà molecolari delle cellule autoritmiche con fenotipo pacemaker-like derivate dalle ESCs di topo, abbiamo indotto il loro differenziamento cellulare attraverso una tecnica basata sulla formazione di aggregati cellulari compatti chiamati *Embryoid Bodies* (EBs). Durante il processo di differenziamento, alcune porzioni degli EBs iniziano a contrarsi spontaneamente suggerendo che alcune cellule si siano differenziate verso il fenotipo cardiaco in particolar modo pacemaker.

I canali HCN sono i correlati molecolari dei canali f , i canali pacemaker nativi, il cui ruolo principale nella generazione della depolarizzazione diastolica lenta e nel controllo della frequenza di scarica dei potenziali d'azione spontanei è stato ampiamente dimostrato (DiFrancesco, 2006). Delle quattro isoforme (HCN1-4), HCN1, HCN2 e HCN4 contribuiscono a livelli differenti alla corrente I_f nel cuore, infatti HCN4 è l'isoforma maggiormente espressa nei miociti pacemaker del nodo senoatriale (Accili *et al.*, 2002).

Per verificare la presenza dei canali HCN e osservare i loro livelli di espressione proteica, abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza sugli interi EBs, a vari stadi di differenziamento, usando anticorpi specifici per le varie isoforme dei canali pacemaker. Inoltre per identificare le porzioni di EBs ricche in miociti, abbiamo co-marcato gli EBs con anticorpi diretti contro specifiche proteine muscolari/cardiache come la caveolina 3. Infatti la caveolina 3 è l'isoforma muscolare di una proteina strutturale che compone le *caveolae*. Le *caveolae* rappresentano un particolare tipo di *lipid rafts* e sono descritte come invaginazioni stabili del sarcolemma dalla caratteristica forma ad omega. Da tempo è noto che i miociti senoatriali sono ricchi in *caveolae*. È stato dimostrato dal nostro laboratorio che, nei miociti senoatriali di coniglio, i canali HCN4 sono localizzati nelle *caveolae* e interagiscono con la caveolina 3 (Barbuti *et al.*, 2004; Barbuti *et al.*, 2007).

Dalle analisi di immunofluorescenza abbiamo osservato che HCN1 e HCN4 sono le uniche subunità HCN espresse durante stadi precoci (giorno 7+3; **Fig.14A, B**), intermedi (giorno 7+8; **Fig.14C, D**) e tardivi (giorno 7+20; **Fig.14E, F**) del differenziamento. La marcatura per HCN è stata osservata esclusivamente in porzioni di EBs positivi per caveolina 3, ad eccezione degli stadi precoci dove la caveolina 3 non è mai stata rilevata (**Fig.14A, B**, destra).

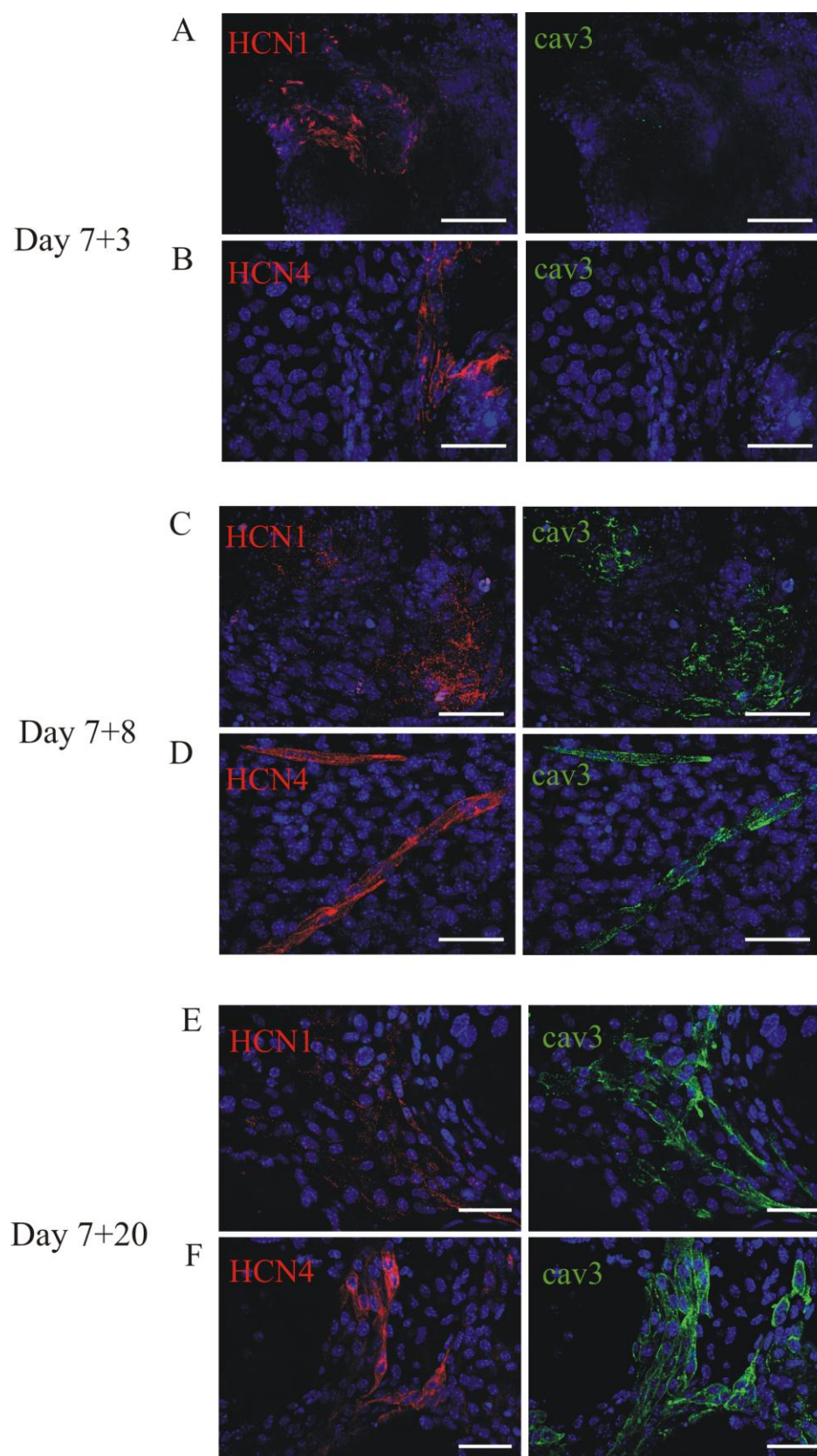


Fig.14. Espressione di HCN1 e HCN4 in EBs interi. Singole sezioni confocali di interi EBs marcati con specifici anticorpi anti-HCN (pannelli di sinistra, rosso) e anti-caveolina 3 (pannelli di destra, verde) al giorno 7+3 (**A**, **B**), 7+8 (**C**, **D**) e 7+20 (**E**, **F**) di differenziamento. I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 40 μm (da Barbuti *et al.*, 2009).

La subunità HCN3 è stata osservata raramente e solo in porzioni caveolina 3-negative di EBs al giorno 7+8 di differenziamento (**Fig.15B**); non abbiamo mai trovato marcatura per HCN3 in EBs al giorno 7+3 (dati non mostrati) e al giorno 7+20 (**Fig.15D**). Il segnale relativo ad HCN2 non è mai stato osservato indipendentemente dallo stadio di differenziamento (**Fig.15A, C**).

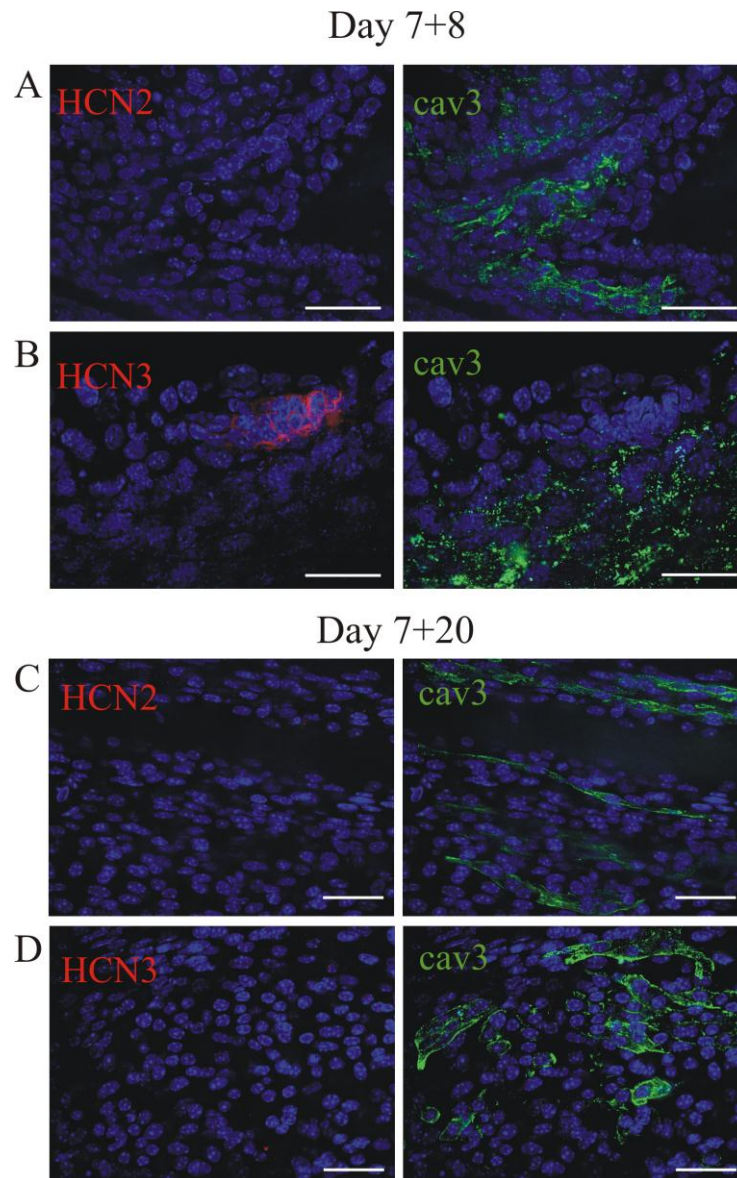


Fig.15. Espressione di HCN2 e HCN3 in EBs interi. L'analisi di immunofluorescenza di interi EBs marcati con specifici anticorpi anti-HCN (pannelli di sinistra, rosso) e anti-caveolina 3 (pannelli di destra, verde), mostra la mancanza di espressione di HCN2 sia al giorno 7+8 (**A**) che al giorno 7+20 (**C**) di differenziamento. L'espressione di HCN3 è stata osservata al giorno 7+8 solo nelle regioni negative per la caveolina 3 (**B**), mentre al giorno 7+20 l'isoforma HCN3 non è stata rilevata (**D**). I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 40 μ m (da Barbuti *et al.*, 2009).

Dato che non abbiamo mai rilevato la presenza di HCN2, sono stati condotti esperimenti di controllo per verificare la funzionalità dell'anticorpo diretto contro questa isoforma. Le cellule CHO sono state trasfettate transientemente con l'isoforma mHCN2 e utilizzate per le analisi di immunofluorescenza. I risultati ottenuti mostrano un'evidente marcatura per il canale HCN2 (**Fig.16**).

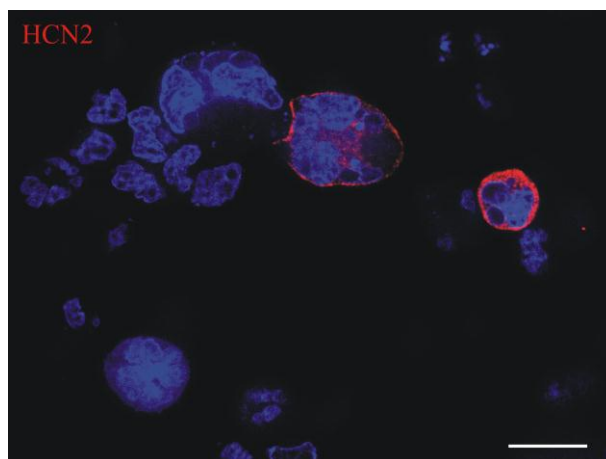


Fig.16. Analisi di immunofluorescenza su cellule CHO trasfettate con HCN2. Singola sezione confocale di cellule CHO, trasfettate transientemente con l'isoforma HCN2 di topo, che mostra un'evidente marcatura a livello della membrana cellulare dopo l'incubazione con lo stesso anticorpo anti-HCN2 utilizzato per gli EBs e per i miociti derivati dalle ESCs. Barra di calibrazione: 20 μm (da Barbuti *et al.*, 2009).

Abbiamo poi studiato l'espressione delle varie isoforme HCN sulle singole cellule ottenute dalla dissociazione degli EBs, usando la caveolina 3 come marker di differenziamento muscolare/cardiac. In accordo con i dati di immunofluorescenza ottenuti sugli interi EBs, abbiamo osservato che i segnali per HCN1 e HCN4 (**Fig.17A**, rosso) sono presenti a livello della membrana di cellule esprimenti caveolina 3 (**Fig.17B**, verde); HCN3 è stato trovato in poche cellule, nessuna delle quali co-esprime caveolina 3 (**Fig.17A e B**), mentre la fluorescenza relativa ad HCN2 non è mai stata rilevata sia in cellule positive che negative per caveolina 3 (**Fig.17A e B**).

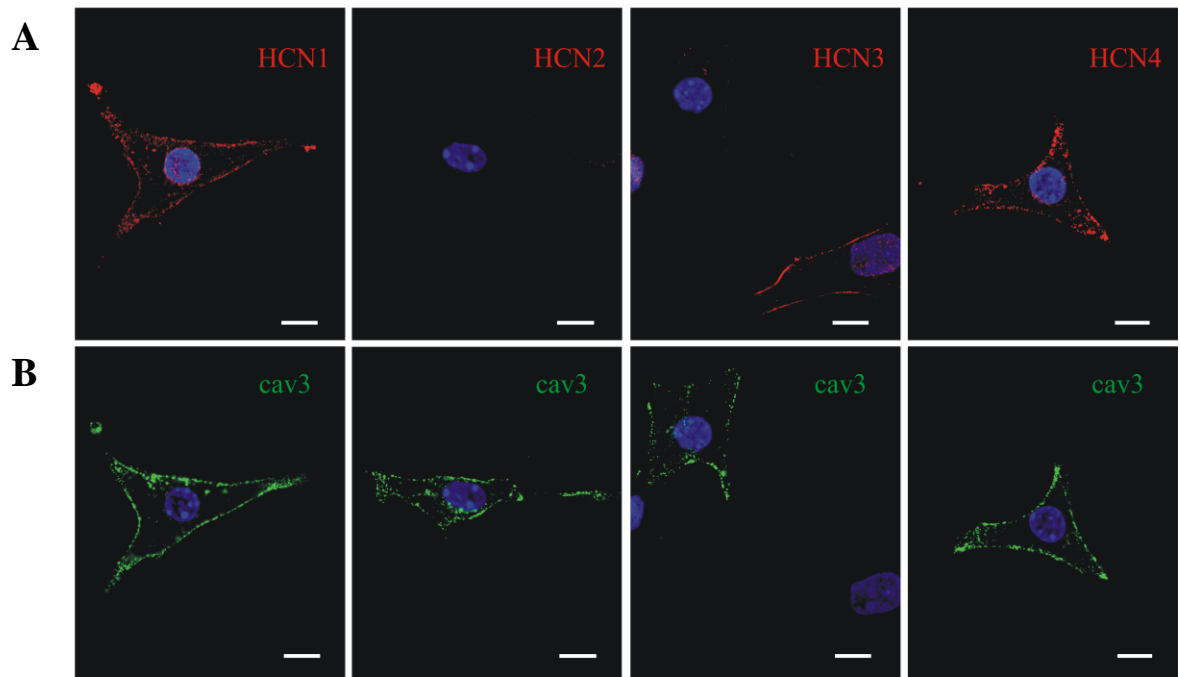


Fig.17. Espressione dei canali HCN nelle singole cellule ottenute dalla dissociazione di EBs. Singole sezioni confocali di cellule isolate derivate da ESCs marcate con anticorpi diretti contro le varie isoforme dei canali HCN, come indicato (**A**, rosso), e contro caveolina 3 (**B**, verde). I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 10 μm (da Barbuti *et al.*, 2009).

Inoltre abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza per verificare se le isoforme HCN1 e HCN4 vengano co-esprese nelle stesse cellule utilizzando anticorpi diretti contro queste due isoforme. Il pannello di sinistra della **Fig.18** (da **A** a **C**) mostra una porzione di un EB al giorno di differenziamento 7+8 in cui entrambe le isoforme HCN4 (**A**, rosso) e HCN1 (**B**, verde) sono state rilevate; la sovrapposizione dei due segnali (**C**, giallo) indica che alcune cellule esprimono entrambe le isoforme, mentre altre cellule esprimono principalmente HCN4 o HCN1. Esperimenti analoghi sono stati condotti sulle cellule isolate dagli EBs. Nel pannello di destra della **Fig.18** (da **D** a **F**), una cellula rappresentativa (da un EB al giorno 7+12 di differenziamento) mostra una parziale co-localizzazione (giallo) di HCN4 (rosso) e HCN1 (verde).

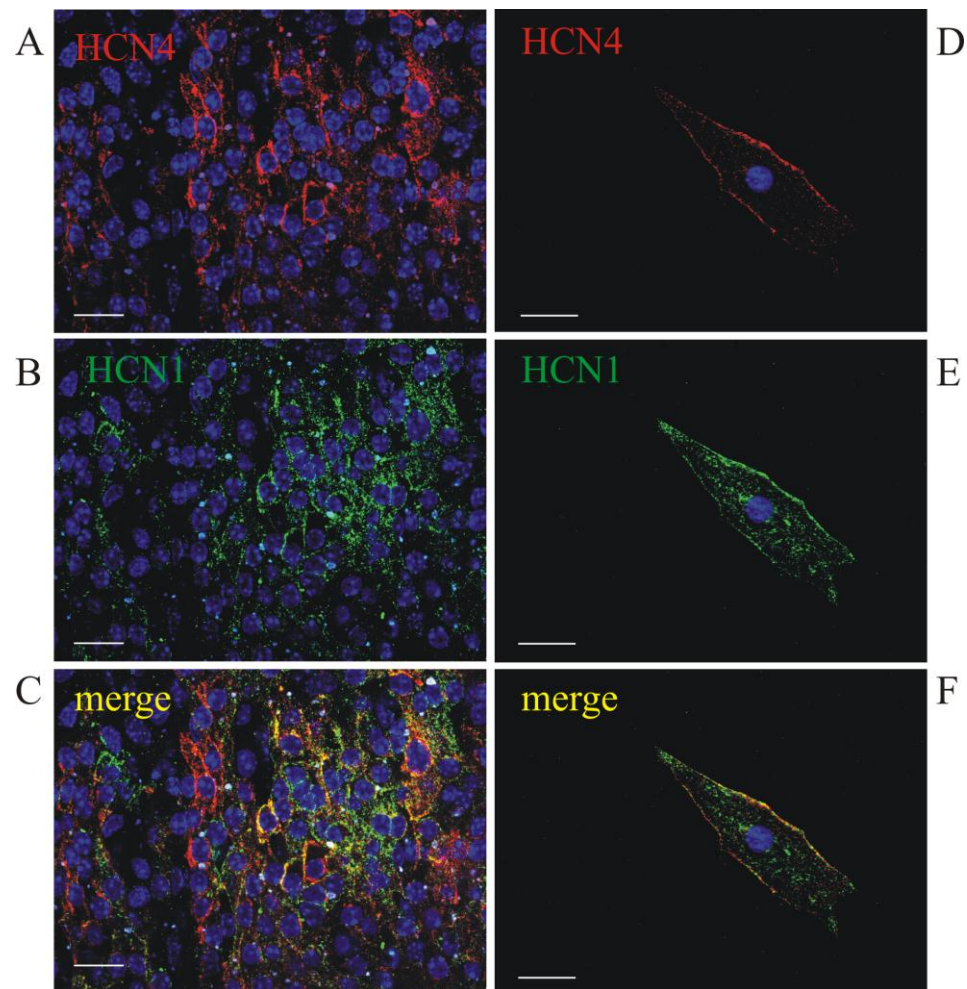


Fig.18. Co-localizzazione in membrana delle isoforme HCN4 e HCN1. A sinistra, immagini confocali di un EB marcato con anticorpi primari anti-HCN4 (A, rosso) e anti HCN1 (B, verde); la sovrapposizione delle immagini mostra una co-localizzazione dei segnali relativi a HCN4 e HCN1 (C, giallo). A destra, singole sezioni di una cellula isolata, derivata dalle ESCs, che mostra segnali specifici per HCN4 (D, rosso) e HCN1 (E, verde), e la co-localizzazione di questi (F, giallo). I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 20 μ m (da Barbuti *et al.*, 2009).

I risultati fin qui ottenuti dimostrano che nei miociti derivati dalle ESCs le uniche isoforme espresse a livelli rilevabili attraverso le analisi di immunofluorescenza, sono HCN4 e HCN1, le stesse isoforme espresse nel NSA di diverse specie (Shi *et al.*, 1999; Marionneau *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Tellez *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006).

Una caratteristica importante delle cellule pacemaker è la modulazione della frequenza di scarica dei potenziali d'azione da parte dei neurotrasmettitori del sistema nervoso autonomo. Gli agonisti β -adrenergici accelerano la frequenza spontanea aumentando la pendenza della fase di depolarizzazione diastolica lenta attraverso uno spostamento positivo della curva di attivazione della corrente I_f , mentre gli agonisti muscarinici rallentano la frequenza con un meccanismo

opposto (DiFrancesco, 1993; Barbuti *et al.*, 2007). La risposta ai neurotrasmettitori implica una via di trasduzione del segnale che coinvolge l'attivazione di specifici recettori accoppiati a proteine G. Abbiamo quindi indagato se le cellule autoritmiche derivate dalle ESCs esprimessero gli stessi tipi di recettori che nei miociti pacemaker nativi danno inizio alle vie di modulazione β -adrenergiche e M2 muscariniche. Abbiamo condotto analisi di immunofluorescenza su singole cellule utilizzando anticorpi diretti contro i recettori β -adrenergici e muscarinici. Immagini rappresentative di questa analisi sono mostrate nella **Fig.19**. Abbiamo osservato che la maggior parte delle cellule positive per la caveolina 3 rivela una forte espressione dei recettori β_1 -adrenergici (pannello **A**) e M2 muscarinici (pannello **C**), mentre i recettori β_2 -adrenergici sono espressi meno frequentemente e in generale più debolmente (pannello **B**).

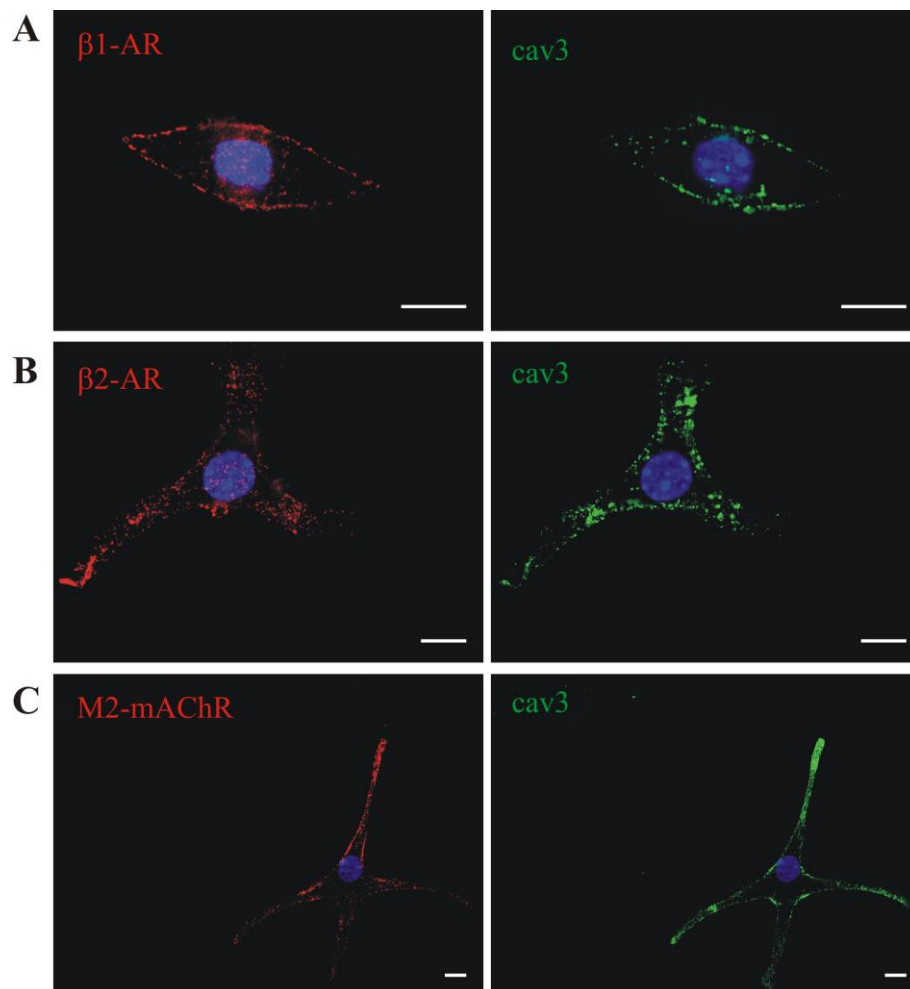


Fig.19. Distribuzione dei recettori β -adrenergici e muscarinici in singole cellule derivate da ESCs. Singole sezioni confocali di cellule derivate da ESCs marcate con anticorpi anti-recettore β_1 -adrenergico (**A**, rosso; β_1 -AR), β_2 -adrenergico (**B**, rosso; β_2 -AR) e M2-muscarinico (**C**, rosso; M2-mAChR); le cellule sono state marcate anche con anticorpi anti-caveolina 3 (pannelli di destra, verde; cav3). I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 10 μ m (da Barbuti *et al.*, 2009).

In conclusione i dati raccolti fin ora dimostrano come le cellule mESCs siano in grado di differenziare verso un fenotipo cardiaco. In particolare una porzione di queste cellule risulta essere autoritmica e presenta caratteristiche molecolari tipiche delle cellule senoatriali native quali l'espressione delle isoforme HCN4 e HCN1 dei canali pacemaker e l'espressione dei recettori β -adrenergici e muscarinici necessari per la corretta interazione con il sistema nervoso autonomo e responsabili della modulazione fisiologica della frequenza cardiaca. Quindi all'interno degli EBs sono presenti miociti con caratteristiche pacemaker ma la loro bassa resa quantitativa (Metzger *et al.*, 1994; Kolossov *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2000; Morikawa *et al.*, 2009) e le difficoltà nell'isolarne una popolazione omogenea e differenziata rendono purtroppo complesso l'utilizzo di queste cellule come substrato autoritmico per la creazione di un pacemaker biologico.

Allo scopo di identificare e successivamente isolare le cellule con fenotipo pacemaker, è stato costruito nel nostro laboratorio un plasmide, definito pHCN4-EGFP, in cui un promotore del gene HCN4 è stato inserito a monte della sequenza codificante per la *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP); in questo modo la trascrizione della EGFP viene attivata nelle cellule in cui il promotore del gene HCN4 è attivo. Il plasmide inoltre presenta una cassetta genica che conferisce resistenza all'antibiotico neomicina, necessario per la selezione delle cellule che hanno integrato nel genoma tale plasmide (**Fig.20**).

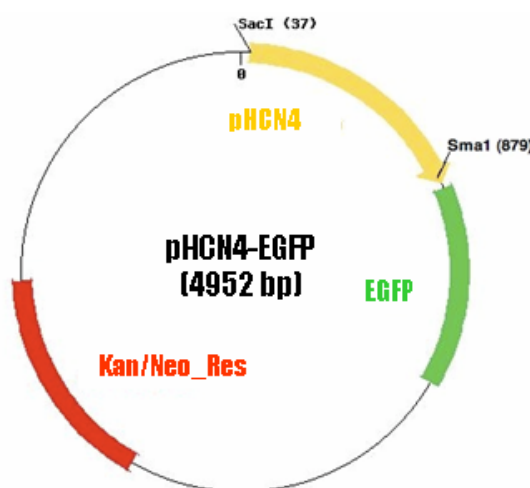


Fig.20. Rappresentazione schematica del plasmide pHCN4-EGFP con resistenza alla neomicina.

Prima di procedere con l'elettroporazione delle mESCs abbiamo testato il funzionamento del plasmide pHCN4-EGFP con una trasfezione di controllo in colture primarie di miociti ventricolari neonatali di ratto che, come dimostrato in letteratura, esprimono livelli piuttosto bassi ma comunque rilevabili di HCN4 (Kuratomi *et al.*, 2007). Nella **Fig.21** è mostrata

un'immagine acquisita al microscopio confocale di una coltura di miociti ventricolari neonatali di ratto marcati con un anticorpo diretto contro HCN4 in cui si osserva la presenza del canale in una cellula.

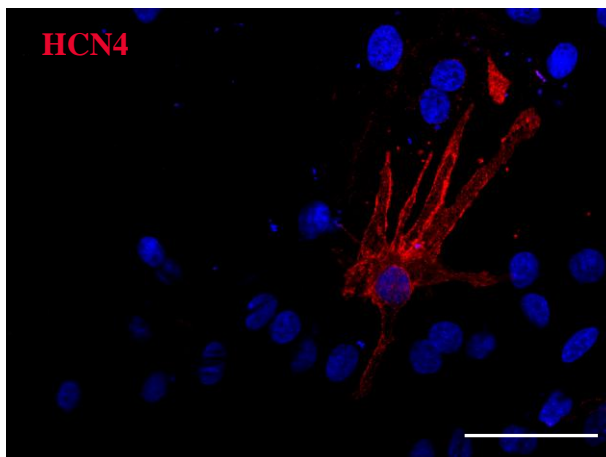


Fig.21. Espressione del canale HCN4 in miociti ventricolari neonatali di ratto. Singola sezione confocale di miociti ventricolari neonatali in cui è mostrata la marcatura relativa a HCN4 in rosso. I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barra di calibrazione: 50 μ m.

Dopo circa 24-48 ore dalla trasfezione, i miociti sono stati osservati al microscopio a fluorescenza per verificare l'espressione della proteina fluorescente EGFP. Nella **Fig.22** è mostrata un'immagine di miociti neonatali trasfettati con il plasmide pHCN4-EGFP in contrasto di fase (**A**) e in fluorescenza (**B**) in cui si osserva l'espressione della EGFP in un miocita.

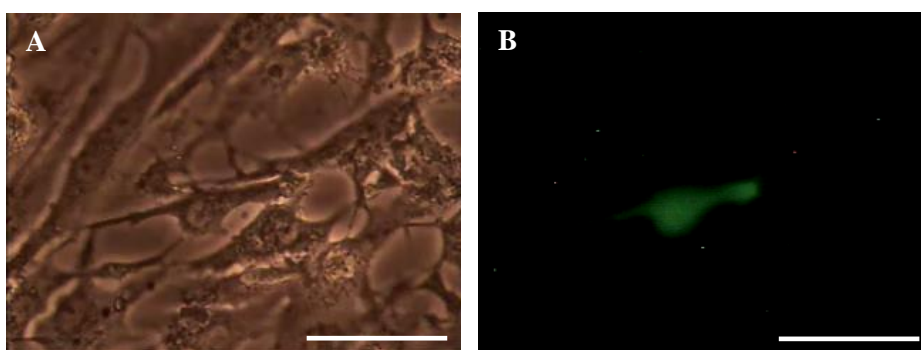


Fig.22. Miociti ventricolari neonatali di ratto trasfettati con il plasmide pHCN4-EGFP in contrasto di fase (**A**) e in fluorescenza (**B**). Barre di calibrazione: 50 μ m.

Per verificare la specificità del segnale rilevato ed escludere che possa trattarsi di autofluorescenza, abbiamo condotto ulteriori esperimenti di controllo. Sono stati trasfettati in

parallelo il plasmide pCMV-EGFP, in cui il gene EGFP è sotto il controllo del promotore costitutivo pCMV (Citomegalovirus) ed il plasmide in assenza del promotore pCMV(-)-EGFP che rappresentano rispettivamente il controllo positivo e negativo. Nella **Fig.23** è mostrata l'immagine di una coltura di miociti ventricolari neonatali di ratto trasfettata con pCMV-EGFP, in contrasto di fase (**A**) e in fluorescenza (**B**), in cui è possibile osservare l'espressione della EGFP in diversi miociti; i pannelli (**C**) ed (**D**) della stessa figura mostrano invece miociti trasfettati con pCMV(-)-EGFP, rispettivamente in contrasto di fase e in fluorescenza, in cui non è stato rilevato alcun segnale relativo alla EGFP.

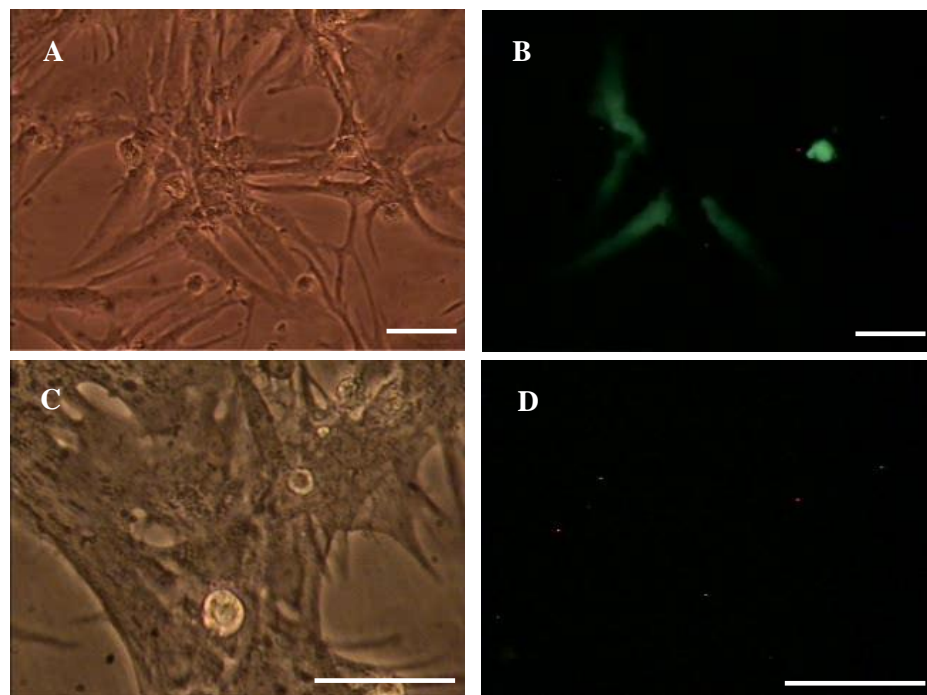


Fig.23. Miociti ventricolari neonatali di ratto trasfettati con il plasmide pCMV-EGFP in contrasto di fase (**A**) e in fluorescenza (**B**) e con il plasmide pCMV(-)-EGFP in contrasto di fase (**C**) e in fluorescenza (**D**). Barre di calibrazione: 50 μ m.

La presenza della proteina fluorescente nei miociti trasfettati con pHCM4-EGFP è stata inoltre confermata tramite esperimenti di immunofluorescenza condotti utilizzando anticorpi diretti contro la GFP (**Fig.24, A**). Anche in questo caso, come controllo negativo sono stati utilizzati i miociti trasfettati con il plasmide pCMV(-)-EGFP nei quali non è stato rilevato alcun segnale (**Fig.24, B**).

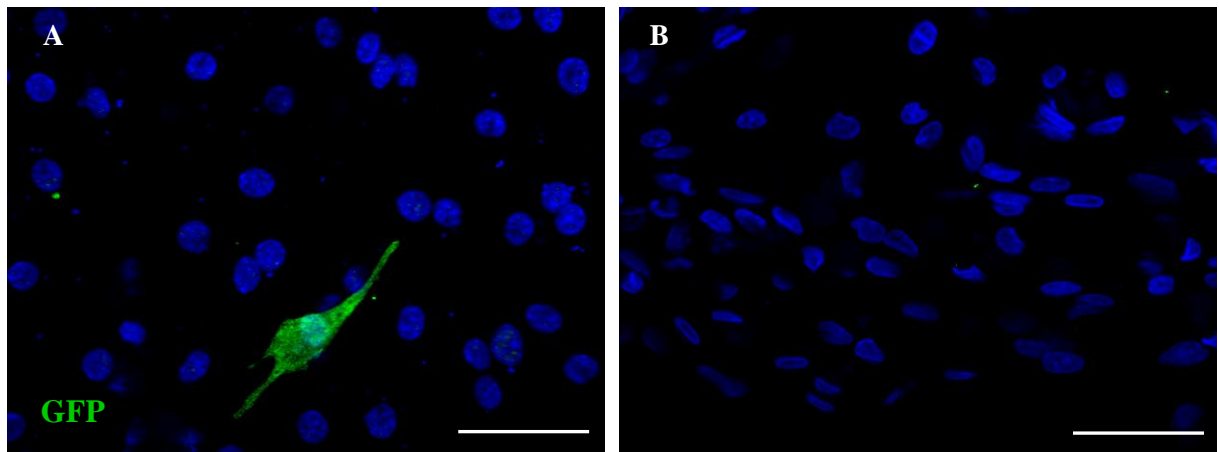


Fig.24. Singole sezioni confocali di miociti ventricolari neonatali trasfettati con pHCN4-EGFP (A) e con pCMV(-)-EGFP (B). In verde è evidenziata la marcatura con anticorpi anti-GFP. I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 50 μ m.

Verificata la funzionalità del plasmide, abbiamo quindi elettroporato le mESCs con il pHCN4-EGFP. Un clone omogeneo di cellule ES ingegnerizzate, selezionato nel nostro laboratorio, è stato poi indotto al differenziamento mediante la tecnica delle *hanging drops* che ha portato alla formazione di EBs. Dall'osservazione al microscopio a fluorescenza gli EBs ottenuti mostrano la presenza di cellule EGFP positive all'interno delle porzioni contrattili (**Fig.25**, da A a C).

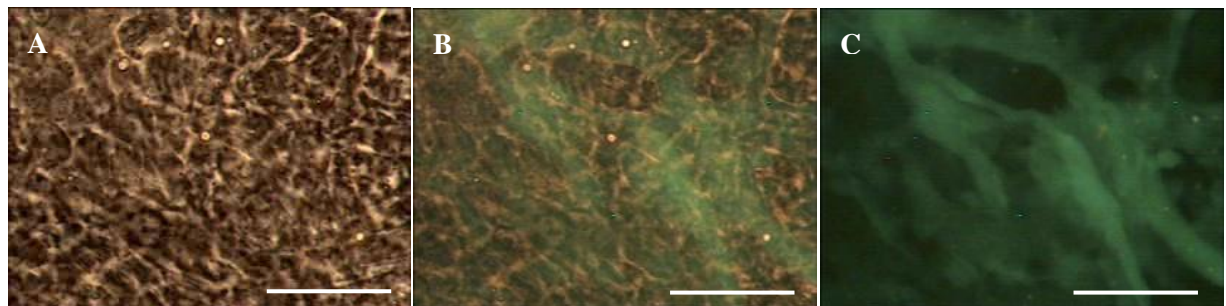


Fig.25. Regione dotata di attività autoritmica di un EB derivato dal differenziamento di ESCs ingegnerizzate con il plasmide pHCN4-EGFP, osservata in contrasto di fase (A) e in fluorescenza (C). In (B) è mostrata la sovrapposizione delle immagini (A) e (C). Barre di calibrazione: 50 μ m.

Al fine di caratterizzare le cellule EGFP positive all'interno degli EBs, abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza. Dato che la EGFP nel plasmide si trova sotto il controllo trascrizionale del promotore del gene HCN4, ci si aspetta che le cellule EGFP positive esprimano il canale pacemaker. Abbiamo quindi utilizzato anticorpi diretti contro la GFP (e le sue varianti, quali la EGFP) e contro HCN4. I risultati ottenuti confermano la presenza di alti livelli di

espressione del canale HCN4 nelle regioni EGFP positive degli EBs (Pannelli **A** e **C** delle Fig.26, 27 e 28).

Per approfondire la caratterizzazione delle cellule EGFP positive e dimostrare la loro natura cardiaca, sono stati utilizzati anche anticorpi diretti contro la caveolina 3, l' α -actinina e la connessina 43, proteine caratterizzanti il tessuto muscolare/cardiaco.

Come già precedentemente accennato, la membrana plasmatica dei miociti senoatriali è ricca in *caveolae* nelle quali i canali HCN4 sono localizzati e interagiscono con la caveolina 3 (Barbuti *et al.*, 2004; Barbuti *et al.*, 2007). La co-espressione nella stessa cellula del canale HCN4 e della caveolina 3 è quindi un buon indice del suo differenziamento verso il fenotipo pacemaker.

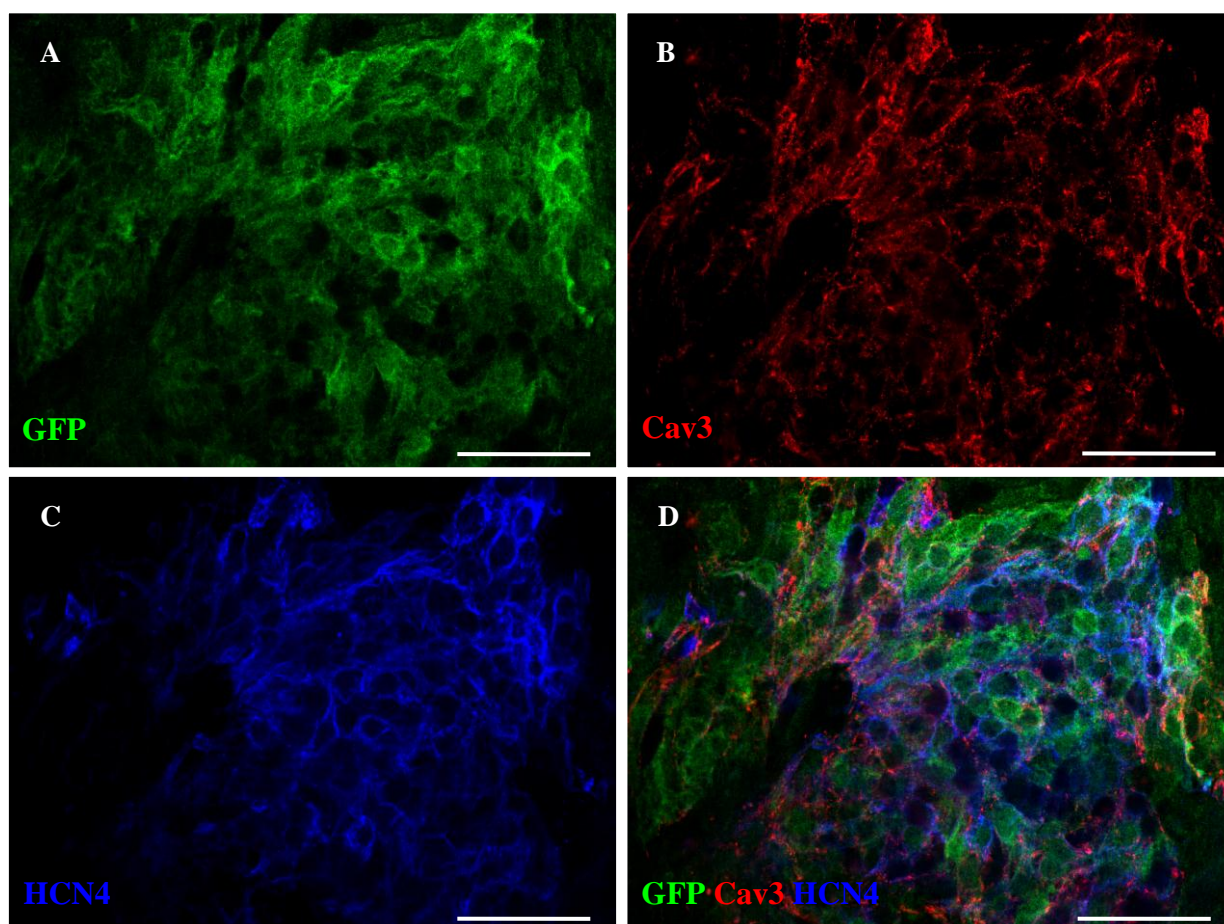


Fig.26. Singole sezioni confocali di EBs al giorno di differenziamento 7+17, ottenuti da mESCs elettroporate con il plasmide pHCN4-EGFP. Nel pannello **A** sono evidenziate in verde le cellule positive per la EGFP; nel pannello **B** è mostrata in rosso la marcatura per la caveolina 3; nel pannello **C** sono marcate in blu le cellule esprimenti HCN4. Nel pannello **D** viene mostrata la sovrapposizione dei tre segnali. Barre di calibrazione: 50 μ m.

Nella **Fig.26B** è possibile osservare un gruppo di cellule all'interno dell'EB esprimenti la caveolina 3. Nella stessa figura, il pannello **D** mostra come le cellule HCN4-EGFP positive presentino la marcatura per la caveolina 3.

L' α -actinina sarcomerica è una proteina che lega l'actina (*actin-binding protein*) presente nelle cellule muscolari (sia cardiache che scheletriche). È associata alle strie Z che definiscono i sarcomeri muscolari. Questa proteina è quindi un buon marcatore cardiaco/muscolare in quanto permette di osservare la presenza di un apparato contrattile e la sua organizzazione in sarcomeri all'interno della cellula.

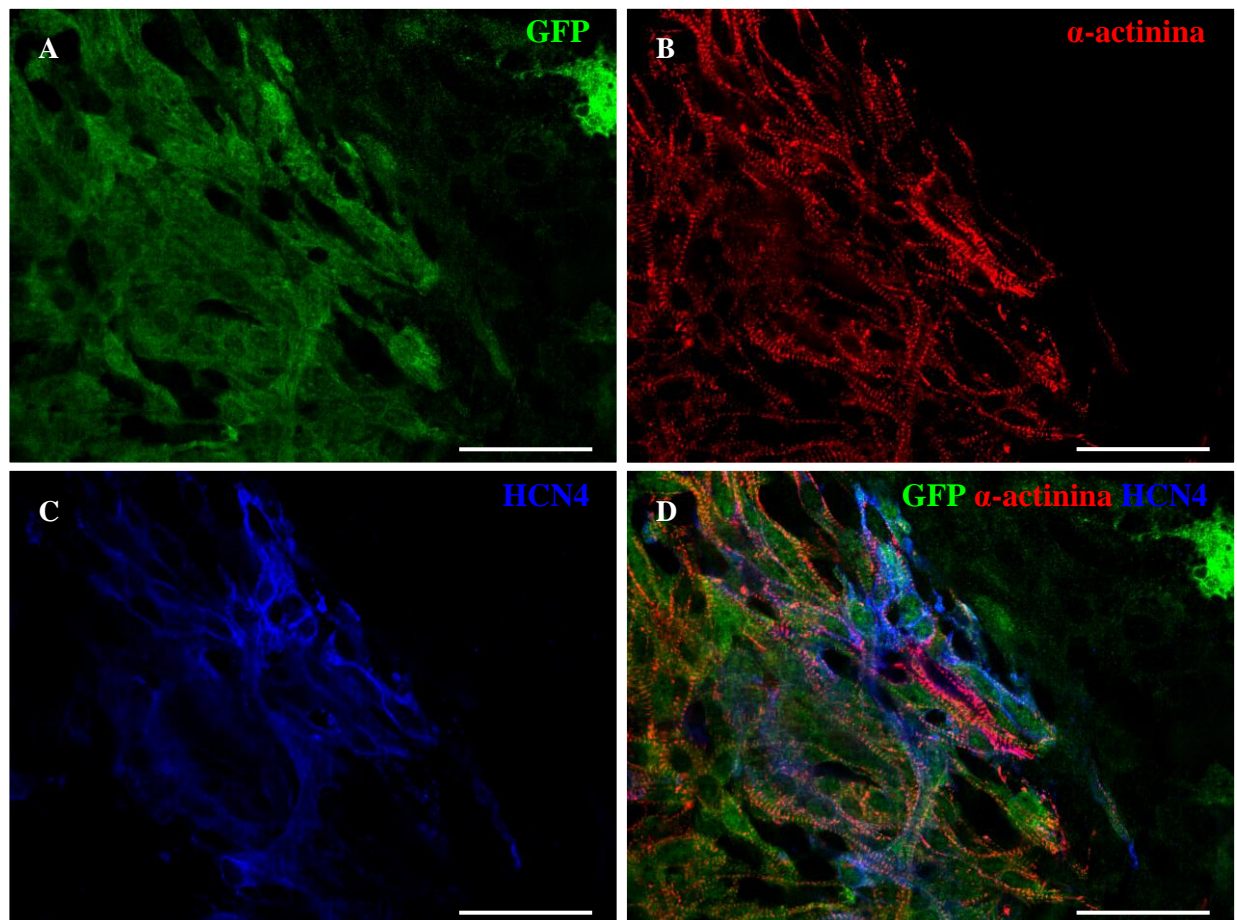


Fig.27. Singole sezioni confocali di EBs al giorno di differenziamento 7+17, ottenuti da mESCs elettroporate con il plasmide pHCN4-EGFP. Nel pannello **A** sono evidenziate in verde le cellule positive per la EGFP; nel pannello **B** è mostrata in rosso la marcatura per l' α -actinina sarcomerica; nel pannello **C** sono marcate in blu le cellule esprimenti HCN4. Nel pannello **D** viene mostrata la sovrapposizione dei tre segnali. Barre di calibrazione: 50 μ m.

Nella **Fig.27B** la marcatura per l' α -actinina mostra come alcune cellule all'interno dell'EB abbiano sviluppato un apparato contrattile organizzato in strutture sarcomeriche. Nel pannello **D** si può osservare come le cellule HCN4-EGFP positive abbiano questa organizzazione sarcomerica.

Le *gap junctions* giocano un ruolo essenziale nel normale funzionamento del sistema cardiaco mediando la propagazione dell'impulso elettrico e assicurando l'accoppiamento elettrico tra le cellule. Nel cuore dei mammiferi la connessina 43 è l'isoforma che compone maggiormente le *gap junctions*. Questa proteina è espressa soprattutto nei cardiomiociti di lavoro in atri e ventricoli ma è presente anche nelle fibre del Purkinje dove compone la parte distale del sistema di conduzione ventricolare (Maria *et al.*, 2006). Essendo l'isoforma cardiaca predominante, la connessina 43 è stata scelta come marker di differenziamento delle cellule ES verso il fenotipo cardiaco.

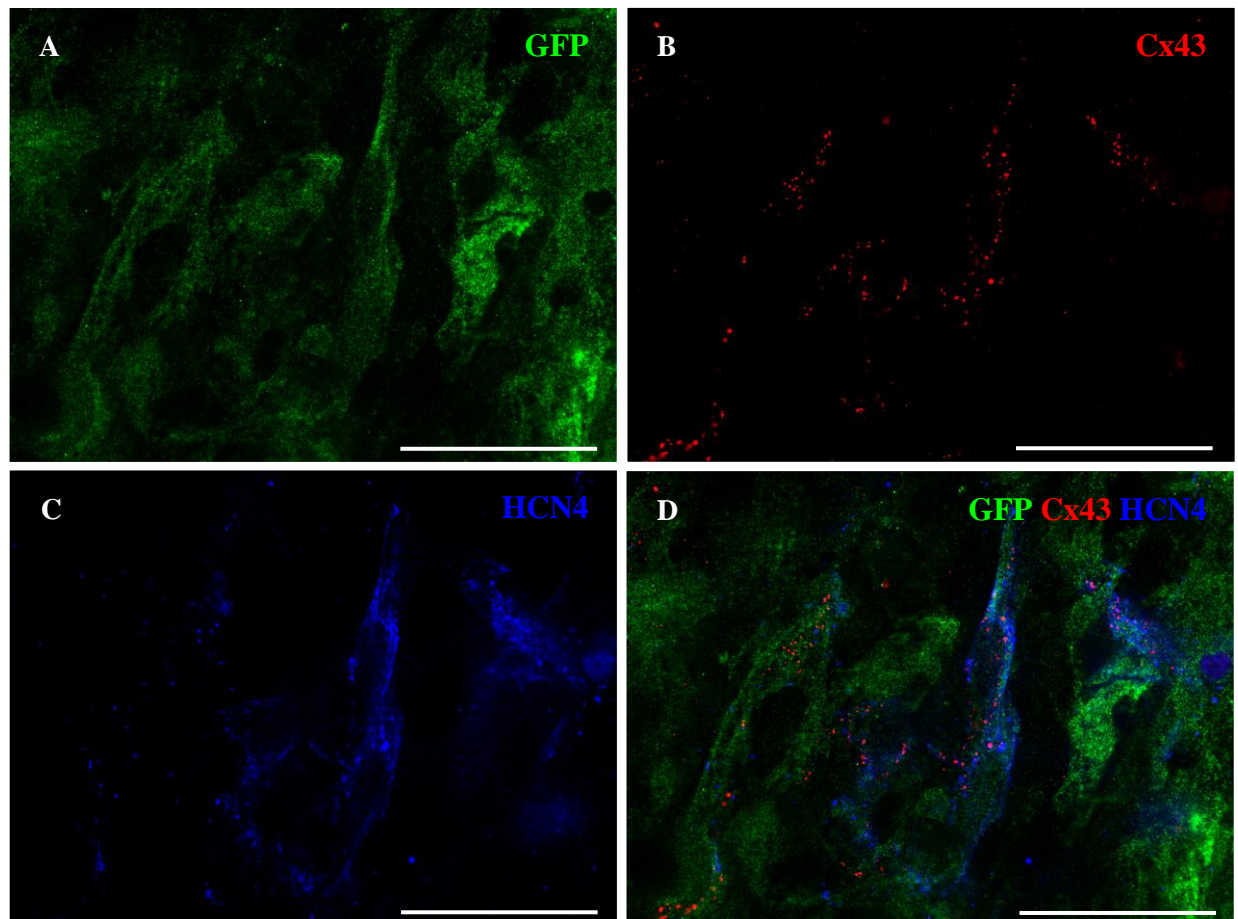


Fig.28. Singole sezioni confocali di EBs al giorno di differenziamento 7+8, ottenuti da mESCs elettroporate con il plasmide pHCN4-EGFP. Nel pannello **A** sono evidenziate in verde le cellule positive per la EGFP; nel pannello **B** è mostrata in rosso la marcatura per la connessina 43; nel pannello **C** sono marcate in blu le cellule esprimenti HCN4. Nel pannello **D** viene mostrata la sovrapposizione dei tre segnali. Barre di calibrazione: 50 μ m.

La **Fig.28B** mostra la presenza di connessina 43 per lo più ai bordi della cellula nei punti in cui presumibilmente le membrane di cellule adiacenti prendono contatto. Nel pannello **D** della stessa figura, si può osservare come alcune cellule HCN4-EGFP positive esprimano la connessina 43 indicando la presenza di *gap junctions* che assicurano la coesione elettrica e meccanica delle cellule e la propagazione dell'impulso elettrico responsabile della loro contrazione sincrona.

Le immagini fino qui mostrate indicano come le cellule EGFP positive abbiano acquisito il fenotipo cardiaco, data la presenza di α -actinina e connessina 43. La positività per HCN4 e la sua co-localizzazione con caveolina 3 indica inoltre la natura pacemaker di queste cellule. I risultati ottenuti dimostrerebbero così che il costrutto pHCN4-EGFP discrimini in modo specifico i miociti pacemaker grazie all'espressione della EGFP.

Nonostante la presenza all'interno di EBs di cellule EGFP positive con caratteristiche di miociti pacemaker, al di fuori delle porzioni autoritmiche si trovano cellule EGFP positive che presentano una morfologia del tutto differente da quella tipica dei miociti e che risultano essere negative per i tre markers precedentemente considerati (caveolina 3, α -actinina e connessina 43; dati non mostrati). Questa osservazione si spiega con il fatto che il canale HCN4 non viene unicamente espresso a livello cardiaco ma è presente anche in altri tipi cellulari, come ad esempio nei neuroni (Ludwig et al., 1998; Moosmang et al., 1999; Seifert et al., 1999).

Ciò rappresenta un grosso ostacolo per la selezione e l'isolamento di una popolazione omogenea di cardiomiociti autoritmici attraverso l'utilizzo del citofluorimetro. Infatti la selezione della popolazione di interesse avviene solo ed esclusivamente attraverso la presenza della EGFP che quindi non è sufficiente a discriminare la natura cardiaca di queste cellule.

Per questo motivo abbiamo deciso di cambiare criterio di selezione: le cellule non vengono più scelte in base alla positività per la EGFP ma in base alla presenza dell'antigene di membrana CD166. La scelta di separare le cellule in base alla presenza di CD166, noto anche come ALCAM (*Activated Leukocytes Cell-Adhesion Molecule*), è motivata da lavori in letteratura che dimostrano come questa proteina sia espressa in maniera predominante nel tubo cardiaco di topo ancora in sviluppo al giorno embrionale 8.5. Dal giorno embrionale 12, quando la struttura di base del cuore si è praticamente formata, l'espressione di ALCAM viene persa in questa regione mentre inizia ad essere presente ad alti livelli in altri organi (Hirata *et al.*, 2006). Quindi l'espressione specifica di ALCAM nel cuore embrionale suggerisce il suo possibile utilizzo come marker di superficie per identificare i cardiomiociti durante gli stadi precoci di differenziamento, in una ristretta finestra temporale. È stato infatti dimostrato come l'antigene di superficie CD166 possa essere usato per isolare, sia dal sacco vitellino di topo al giorno embrionale 8.5 che da culture di cellule ES umane al giorno 12 di differenziamento, una popolazione cellulare arricchita in cardiomiociti (Murakami *et al.*, 2007; Rust *et al.*, 2009).

Partendo dallo stesso clone di mESCs elettroporato con il plasmide pHCN4-EGFP, abbiamo analizzato al citofluorimetro EBs al giorno 7+1 di differenziamento. Abbiamo scelto di analizzare e selezionare le cellule al giorno 7+1 in quanto analisi di PCR quantitativa condotte nel nostro laboratorio hanno dimostrato che questo stadio di differenziamento è quello in cui si riesce a isolare una popolazione maggiormente arricchita in cardiomiociti (**Fig.29**).

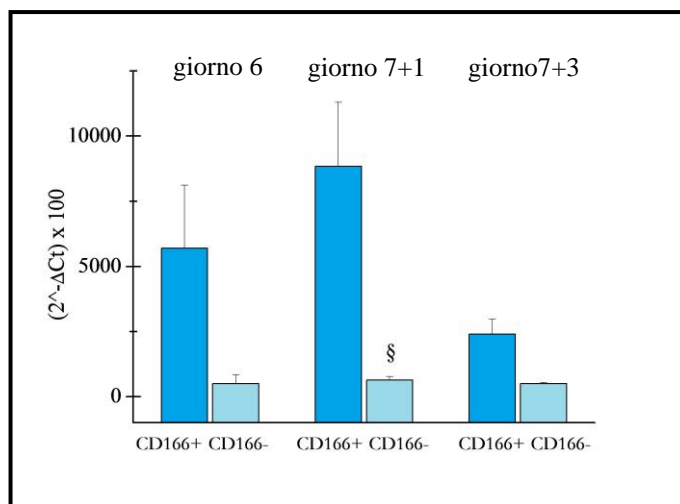


Fig.29. Istogramma rappresentativo di analisi di PCR quantitativa. In ordinata la formula $(2^{-\Delta Ct}) \times 100$ esprime la quantificazione relativa dell'espressione di α -actinina calcolata rispetto a un gene housekeeping preso come riferimento.

Le singole cellule ottenute da questi EBs sono state separate al citofluorimetro, in base alla presenza del marker CD166, in due sottopopolazioni: le CD166+ sono le cellule che esprimono tale proteina, mentre le CD166- sono quelle in cui l'antigene è assente (**Fig.30**).

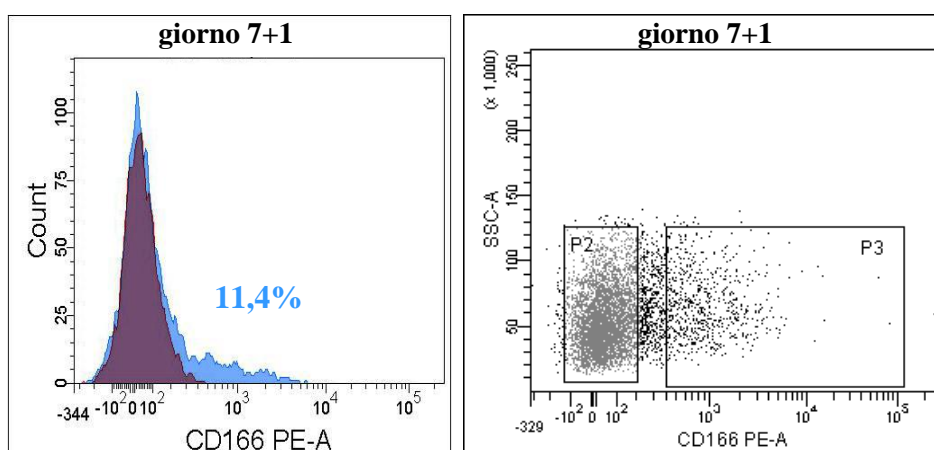


Fig.30. Grafici rappresentativi di un'analisi citofluorimetrica condotta su EBs al giorno di differenziamento 7+1. In **A**, la regione blu scura indica il controllo, mentre quella azzurra la popolazione che esprime il CD166. In **B**, P2 indica la sottopopolazione negativa mentre P3 quella positiva a CD166.

Una volta separate, le due sottopopolazioni vengono mantenute per circa 24 ore in una piastra a bassa adesione in modo da favorire la formazione di aggregati cellulari. Dopo questo passaggio nella sottopopolazione CD166+, che in media rappresenta l'11,4% delle cellule analizzate, è possibile osservare la presenza di gruppi cellulari in grado di contrarsi spontaneamente. Per favorire il contatto tra gli aggregati cellulari, questi vengono piastrati in piastre per colture cellulari in zone delimitate da cilindri di vetro, che vengono successivamente rimossi. In queste condizioni la sottopopolazione CD166+ forma un singolo aggregato di cellule che presenta attività autoritmica, mentre nella sottopopolazione CD166- si osserva spesso la presenza di grossi aggregati cellulari, che a volte riformano strutture simili a veri e propri EBs. La formazione di nuovi EBs può essere spiegata con la presenza, tra le cellule CD166- di cellule indifferenziate, che possiedono ancora caratteristiche di staminalità oppure con elevata capacità replicativa.

Da queste prime osservazioni sembra che l'antigene CD166 identifichi effettivamente una popolazione cellulare ricca in cardiomiociti dotati di attività spontanea. Per valutare e quantificare la presenza di miociti cardiaci nelle sottopopolazioni CD166+ e CD166-, abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza utilizzando l' α -actinina sarcomerica come marker cardiaco/muscolare. Sono state prese in esame sottopopolazioni tenute in coltura dopo la selezione al citofluorimetro dai tre ai tredici giorni. Per quantificare il numero cardiomiociti abbiamo contato le cellule positive all' α -actinina prendendo in considerazione 4 campi ad ingrandimento 20X per ogni vetrino allestito. I risultati ottenuti mostrano come la sottopopolazione CD166+ sia composta per il 60,1% da cellule positive all' α -actinina, quindi di natura cardiaca/muscolare, mentre nella sottopopolazione CD166- sia presente solo il 3,6% (**Fig.31A, B e C**).

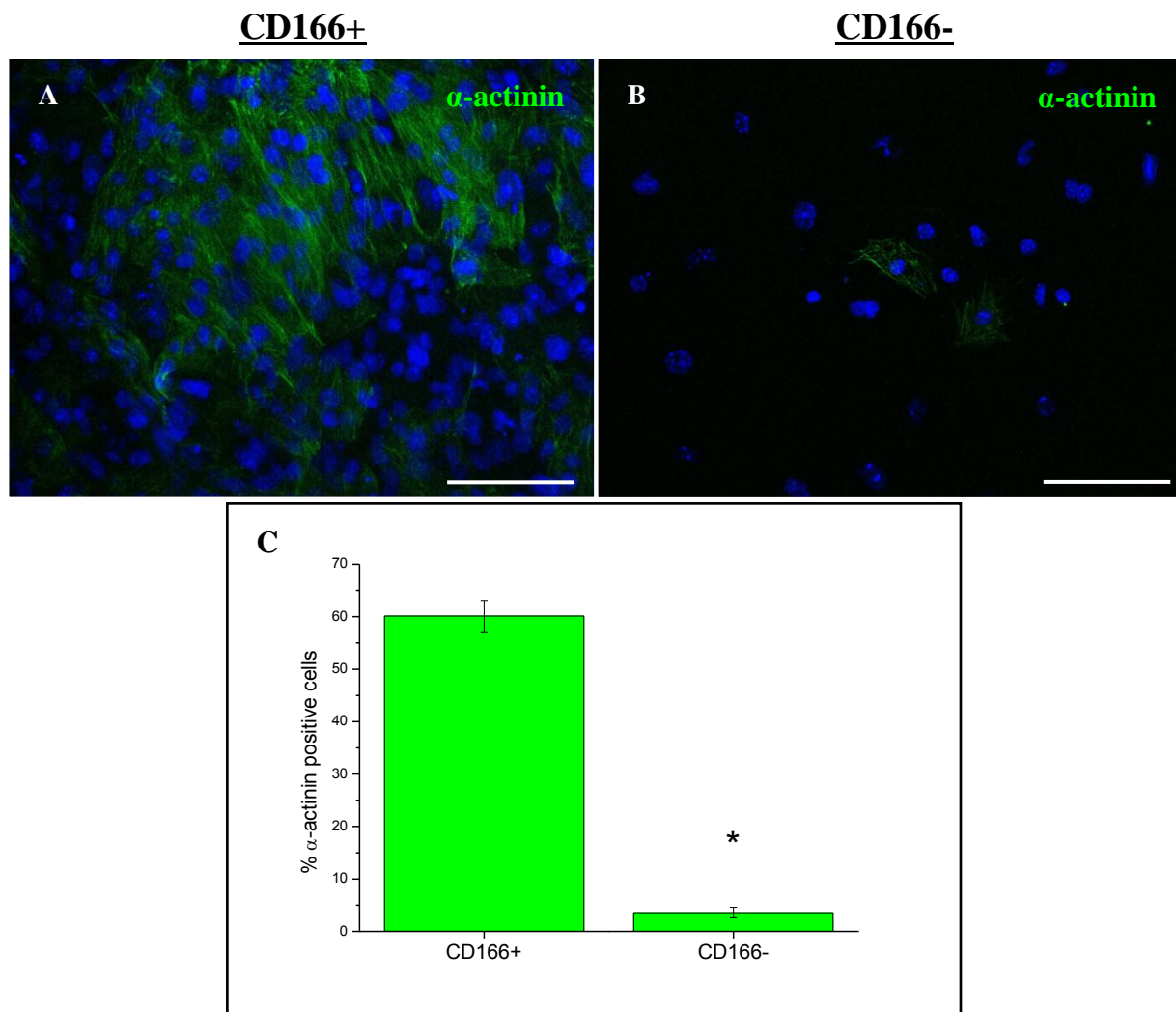


Fig.31. Nei pannelli **A** e **B** sono mostrate due immagini rappresentative di immunofluorescenza condotte sulle sottopopolazioni CD166+ e CD166- al giorno 7+1+3 di coltura. In particolare il pannello **A** mostra una netta positività per l' α -actinina nella sottopopolazione CD166+. Nel pannello **B** invece è possibile osservare un'espressione decisamente inferiore di α -actinina nella sottopopolazione CD166-. I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 50 μ m. Nel pannello **C** sono mostrati gli istogrammi relativi alle percentuali di cellule α -actinina positive nelle due sottopopolazioni. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$ da Test-t di Student). CD166+: 60,13% \pm 3,00%, N = 11; CD166-: 3,60% \pm 1,01%, N = 11 (i valori sono riportati come media \pm errore standard della media; N è il numero dei campioni analizzati e utilizzati nella statistica).

Il marker CD166 ci ha così permesso di isolare una popolazione arricchita in cardiomiociti che presenta attività contrattile spontanea. Al fine di verificare la presenza di cellule con fenotipo pacemaker all'interno di questa popolazione, abbiamo condotto analisi di immunofluorescenza sulle sottopopolazioni CD166+ e CD166- utilizzando anticorpi diretti contro il canale HCN4 e diretti contro l' α -actinina. La statistica è stata eseguita contando il numero delle cellule positive sia per HCN4 che per l' α -actinina. Per ogni vetrino allestito abbiamo preso in considerazione dai 4 ai 15 campi ad ingrandimento 40X. L'analisi ha permesso di stabilire che, nella

sottopopolazione CD166+, il 42,8% delle cellule che esprimono l' α -actinina presenta marcatura per HCN4, mentre nella sottopopolazione CD166- il 5,1% delle cellule α -actinina positive esprime anche il canale HCN4 (**Fig.32** da **A** a **F** e **Fig.33**).

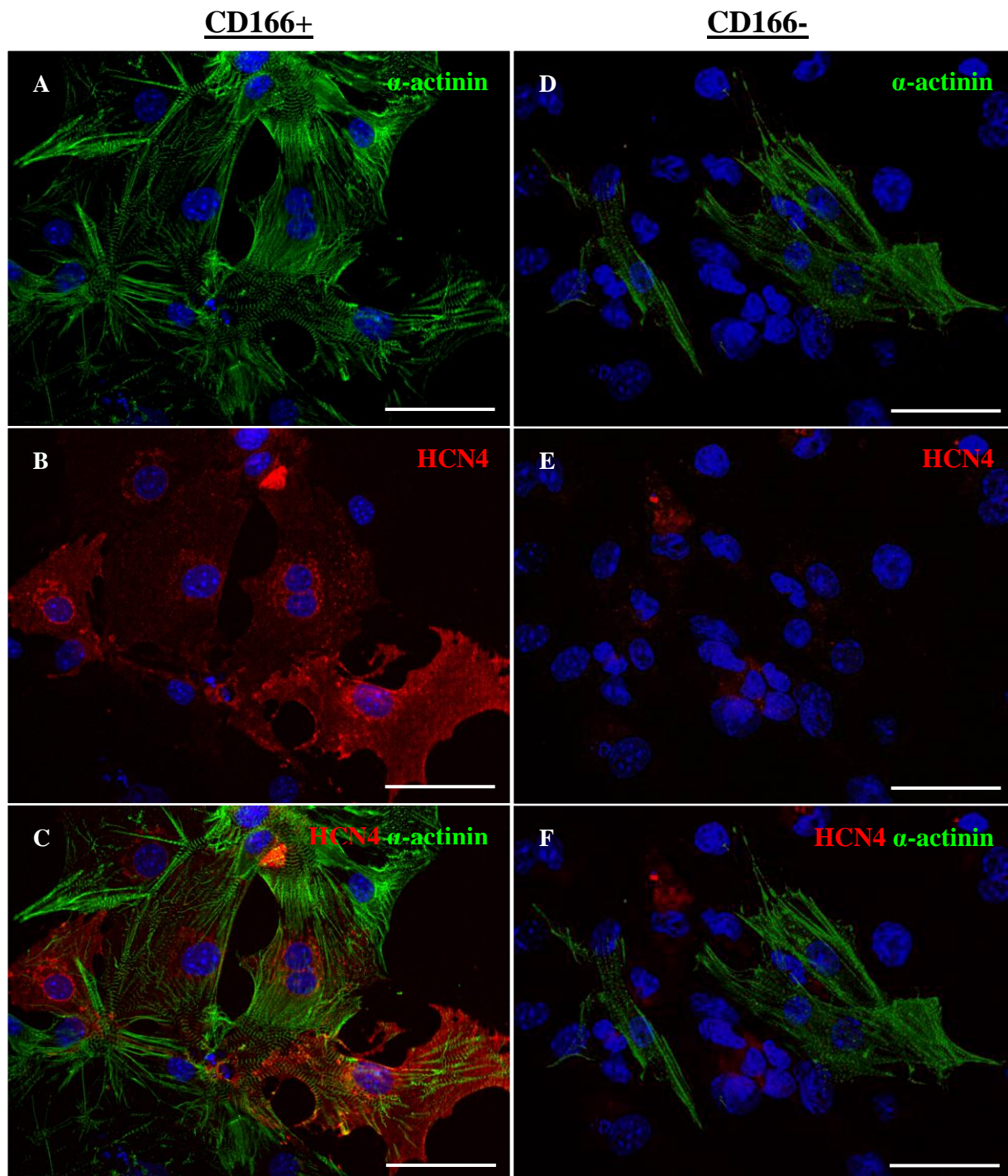


Fig.32. Nei pannelli da **A** a **F** sono mostrate immagini rappresentative di immunofluorescenza condotte sulle sottopopolazioni CD166+ (da **A** a **C**) e CD166- (da **D** a **F**) al giorno 7+1+7 di coltura. Nei pannelli **A** e **D** è possibile osservare in verde la marcatura per l' α -actinina. Nei pannelli **B** e **E** viene mostrata in rosso l'espressione del canale HCN4. La sovrapposizione dei due segnali (α -actinina e HCN4) viene infine presentata nei pannelli **C** e **F**. I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 50 μ m.

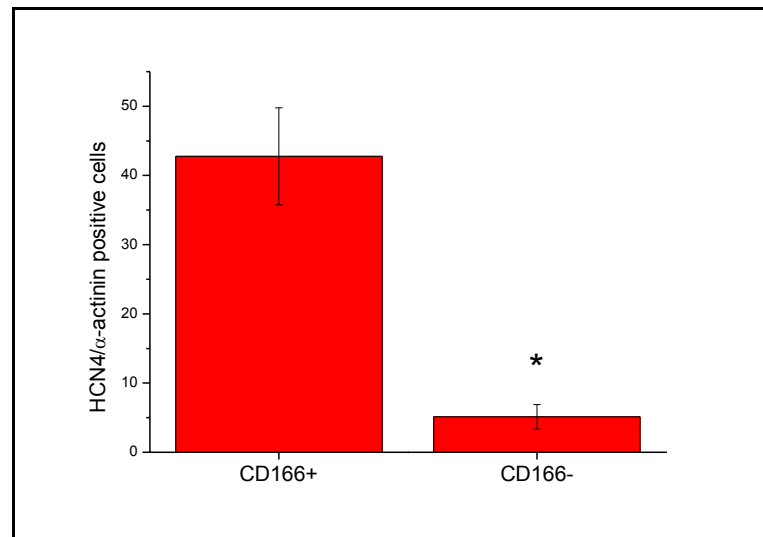


Fig.33. Istogrammi relativi alle percentuali di cellule che presentano marcatura per HCN4 su quelle α -actinina positive nelle sottopopolazioni CD166+ e CD166-. L'asterisco indica una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$ da Test-t di Student). CD166+: 42,77% \pm 7,02%, N = 6; CD166-: 5,12% \pm 1,78%, N = 11 (i valori sono riportati come media \pm errore standard della media; N è il numero dei campioni analizzati e utilizzati nella statistica).

Da questi risultati emerge una notevole differenza nella composizione cellulare delle due sottopopolazioni isolate. Le cellule CD166+ sono composte per il 60% da cardiomiociti dotati di un apparato contrattile ben sviluppato. Di questo 60%, quasi il 43% è formato da cellule con caratteristiche pacemaker esprimenti alti livelli del canale HCN4. La sottopopolazione CD166- invece sarà costituita da cellule di varia natura e non appartenenti al fenotipo cardiaco dato che presenta un bassissimo numero di cellule α -actinina positive (3,6%), di cui poco più del 5% esprime il canale HCN4.

Inoltre la sottopopolazione CD166+ presenta un'elevata capacità di sopravvivere per lungo tempo in coltura. Infatti dopo un mese dal sorting gli aggregati cellulari presentano ancora attività spontanea. Questa caratteristica è di fondamentale importanza per lo sviluppo di un pacemaker biologico, infatti le cellule che formeranno il substrato autoritmico e che verranno impiantate nell'ospite ricevente, dovranno integrarsi correttamente nel nuovo tessuto e rimanere vitali per la sopravvivenza dell'ospite stesso. A questo proposito abbiamo condotto esperimenti di immunofluorescenza sulla sottopopolazione CD166+ a quattro settimane di coltura dopo il sorting. Per verificare la presenza di cardiomiociti con fenotipo pacemaker anche dopo diversi giorni in coltura, abbiamo utilizzato anticorpi diretti contro la caveolina 3 e contro HCN4. Come è possibile osservare dalla **Fig.34**, le cellule esprimenti il canale HCN4 mostrano marcatura anche per la caveolina 3. La co-localizzazione di HCN4 e caveolina 3 fornisce un'ulteriore conferma della presenza di cellule con fenotipo pacemaker nella sottopopolazione CD166+.

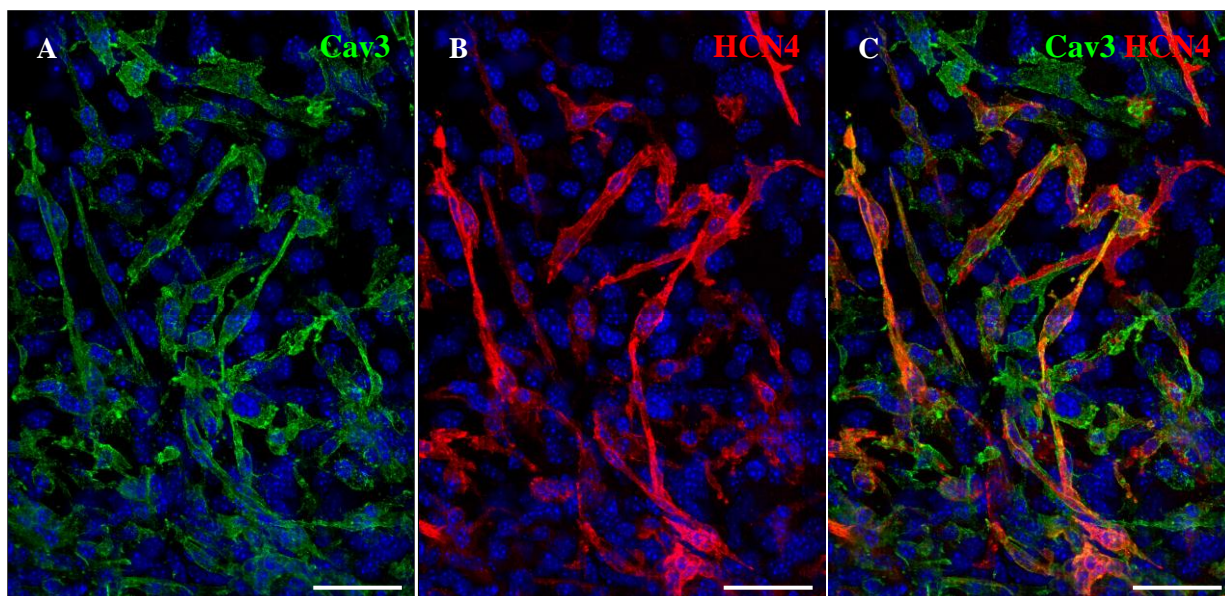


Fig.34. Singole sezioni confocali di un aggregato di cellule CD166+ al giorno 7+1+25 di coltura. Nel pannello **A** sono marcate in verde le cellule esprimenti la caveolina 3. Nel pannello **B** è possibile osservare in rosso le cellule esprimenti HCN4. Nel pannello **C** viene mostrata la sovrapposizione dei segnali relativi alla caveolina 3 e a HCN4. I nuclei sono stati evidenziati con DAPI. Barre di calibrazione: 50 μ m.

Dato che le cellule da noi utilizzate contengono il plasmide pHCN4-EGFP, abbiamo voluto verificare se la sottopopolazione CD166+ esprimesse la proteina fluorescente. Dall'osservazione al microscopio a fluorescenza risulta che la maggior parte di queste cellule esprime anche la EGFP. Questo dato conferma una costante attivazione del promotore di HCN4 e quindi il fenotipo pacemaker di queste cellule (**Fig.35**).

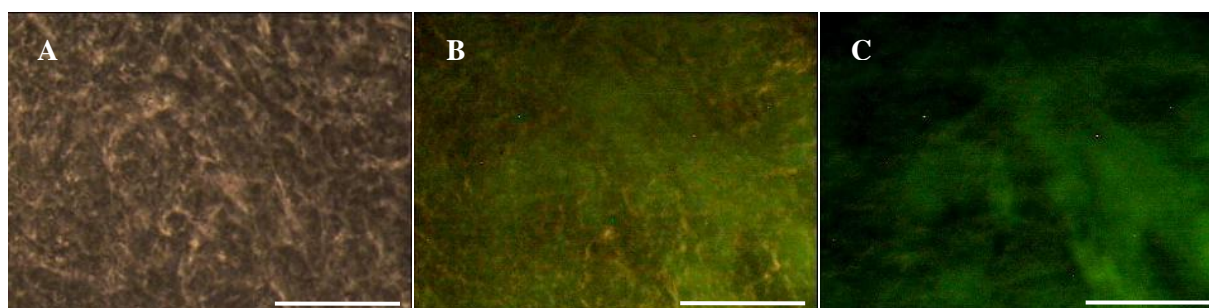


Fig.35. Immagini di un aggregato di cellule CD166+ acquisite grazie al microscopio a fluorescenza. Il pannello **A** individua una porzione autoritmica in luce trasmessa. Il pannello **C** mostra l'acquisizione della stessa porzione in fluorescenza ottenuta eccitando la EGFP. Invece il pannello **B** propone la sovrapposizione delle due immagini precedenti. Barra di calibrazione: 50 μ m.

In conclusione possiamo affermare che la proteina di membrana CD166, può essere utilizzata, in un preciso stadio di differenziamento, come marcatore molecolare al fine di isolare una popolazione cellulare arricchita in cardiomiociti pacemaker. Le cellule CD166+ isolate sono in grado aggregarsi e connettersi elettricamente formando un tappeto cellulare in grado di contrarsi autonomamente. All'interno di questa popolazione infatti abbiamo dimostrato la presenza di un elevato numero di cellule con fenotipo pacemaker in grado di generare potenziali d'azione spontanei. Analisi più approfondite dovranno essere svolte per caratterizzare ulteriormente queste cellule sia dal punto di vista funzionale che molecolare. I dati raccolti fin ora mostrano come queste cellule presentino le caratteristiche necessarie per essere utilizzate come substrato cellulare autoritmico nella generazione di un pacemaker biologico.

Discussione

L'utilizzo di cellule staminali per lo sviluppo di approcci terapeutici alternativi nel trattamento di patologie degenerative è oggi un campo di estremo interesse da parte della comunità scientifica. In particolare, la rigenerazione del tessuto cardiaco in seguito ad eventi ischemici o ad altri tipi di patologie cardiovascolari potrebbe rappresentare un grosso passo avanti in quest'ambito in cui le terapie ad oggi utilizzate sono palliative e non sono in grado di ripristinare la funzionalità dell'organo compromesso. Ad esempio, nel caso di patologie che causano disturbi nella generazione o propagazione del ritmo cardiaco, l'intervento terapeutico più diffuso consiste nell'impianto di pacemakers elettronici. Nonostante questi apparecchi risultino di fondamentale importanza per la sopravvivenza del paziente, essi non sono in grado di eguagliare le performance del pacemaker naturale, in quanto presentano il grosso svantaggio di non poter essere finemente modulati da parte del sistema nervoso autonomo. Inoltre vanno considerate altre limitazioni quali la difficoltà di impianto e adattamento in pazienti pediatrici, la necessità di manutenzione e i disagi legati all'interazione con gli apparecchi che generano campi magnetici. Lo scopo principale del nostro laboratorio è la creazione di un substrato autoritmico che sia eventualmente in grado di funzionare come tessuto pacemaker capace di guidare un tessuto quiescente e generare quindi un ritmo fisiologico stabile e modulabile da parte del sistema nervoso autonomo. Questo substrato cellulare deve quindi possedere caratteristiche elettriche e molecolari il più possibile simili a quelle del nodo senoatriale, il pacemaker naturale del cuore. Abbiamo scelto di utilizzare le cellule ES di topo in quanto hanno un'elevata capacità di "self-renewal", possono essere facilmente mantenute in uno stato indifferenziato, si prestano alla manipolazione genica e inoltre presentano il più alto grado di plasticità differenziativa essendo in grado di generare cellule differenziate appartenenti a tutti i tessuti di un organismo. Un altro aspetto che rende le cellule staminali embrionali adatte all'utilizzo in campo rigenerativo, è la presenza di protocolli precisi di differenziamento che permettono una piena riproducibilità delle condizioni sperimentali. Già agli inizi degli anni '90, furono condotti esperimenti che dimostrarono la capacità delle cellule staminali embrionali di differenziarsi spontaneamente verso un fenotipo cardiaco (Wobus *et al.*, 1991; Maltsev *et al.*, 1993). Da allora diversi gruppi di ricerca si sono dedicati allo studio dello sviluppo e del differenziamento di queste cellule verso un fenotipo cardiaco, ponendo l'attenzione anche su geni e fattori precoci responsabili dell'avvio di tale processo. Una tecnica che consente di ottenere *in vitro* cellule differenziate verso la linea cardiaca, è quella di coltivare le cellule staminali embrionali nelle così dette "hanging drops", che favoriscono la formazione di EBs ed il successivo differenziamento. All'interno di questi

EBs è stata dimostrata essere presente una popolazione cellulare con caratteristiche elettriche e molecolari tipiche delle cellule senoatriali native (Qu *et al.*, 2007; Yanagi *et al.*, 2007; Barbuti *et al.*, 2009). La presenza di cellule con caratteristiche pacemaker in grado di contrarsi spontaneamente è di fondamentale importanza ai fini del nostro progetto. Un primo passo importante per ottenere cellule pacemaker derivate da cellule ES, è di caratterizzare le loro proprietà molecolari.

Nei mammiferi, la generazione dell'attività pacemaker del nodo senoatriale è sotto il controllo dei canali f , i cui correlati molecolari sono principalmente le subunità HCN4, con un limitato contributo, dipendente dalla specie animale presa in considerazione, delle subunità HCN1 e/o HCN2. Infatti le isoforme dei canali pacemaker maggiormente espresse a livello del NSA umano e di diverse specie animali sono HCN1 e HCN4 (Chandler *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 1999; Moroni *et al.*, 2001). In particolare recenti studi hanno dimostrato, tramite esperimenti di immunofluorescenza ed ibridazione *in situ*, che l'isoforma HCN4 discrimina in modo specifico la regione del NSA di topo e coniglio (Ishii *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2007; Brioschi *et al.*, 2009). Evidenze dell'importanza del gene HCN4 nel controllo della frequenza cardiaca derivano inoltre sia da studi condotti su modelli murini *knock out* che da studi genetici della popolazione umana. E' stato infatti dimostrato che topi *knock out* per il gene HCN4 muoiono tra il giorno embrionale 9.5 e 11.5, mentre al giorno embrionale 9 presentano una frequenza cardiaca significativamente ridotta rispetto al *wild type* e all'eterozigote (Stieber *et al.*, 2003). Negli ultimi anni sono state caratterizzate diverse mutazioni ereditarie del gene HCN4 umano che causano vari disturbi del ritmo cardiaco (Milanesi *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2004). In accordo con lavori pubblicati, è presente una certa variabilità di espressione dei canali HCN nei miociti derivati dalle ESCs. Studi precedenti hanno dimostrato la presenza dell'mRNA dei canali HCN nelle cellule staminali embrionali murine pluripotenti: van Kempen e collaboratori hanno mostrato la presenza del messaggero per le isoforme HCN1 e HCN4 sia nelle cellule indifferenziate sia dopo differenziamento (van Kempen *et al.*, 2003). In un lavoro successivo White & Claycomb hanno dimostrato tramite real-time PCR che le cellule autoritmiche derivate dalle ESCs presentano tutte e quattro le isoforme HCN anche se HCN2 e HCN3 risultano molto più abbondanti delle altre (White and Claycomb, 2005). Inoltre è stato riportato che le colonie flk-1 positive derivate dalle ESCs mostrano una marcatura diffusa per HCN1 e HCN4 quando differenziate in cardiomiociti. I nostri esperimenti di immunofluorescenza rappresentano la prima evidenza della localizzazione dei canali HCN sulla membrana plasmatica di singoli cardiomiociti derivati da ESCs e di interi EBs. I risultati ottenuti hanno rivelato una chiara espressione in membrana solo delle isoforme HCN4 e HCN1 in cellule differenziate verso un fenotipo cardiaco/muscolare, come evidenziato dalla co-marcatura con la proteina caveolina 3 (**Fig.14, 17 e 18**). La caveolina 3 è l'isoforma

muscolare di una proteina strutturale che compone le caveolae ed è abbondantemente espressa nelle cellule senoatriali. Lavori recentemente pubblicati dal nostro laboratorio hanno dimostrato come, nei miociti senoatriali di coniglio, HCN4 co-localizza e interagisce con caveolina 3 e che questa interazione è importante per la funzionalità e la modulazione del canale stesso (Barbuti *et al.*, 2004; Barbuti *et al.*, 2007). I dati mostrati supportano quindi l'ipotesi che la localizzazione e l'interazione dei canali HCN con la caveolina 3 potrebbero essere importanti durante lo sviluppo/maturazione dei miociti pacemaker. Nonostante l'isoforma HCN2 sia quella maggiormente espressa a livello dei ventricoli adulti (Shi *et al.*, 1999), tessuti la cui abbondanza supera di gran lunga quella del tessuto di conduzione, non abbiamo mai rilevato questa isoforma né nelle cellule singole né negli EBs interi (**Fig.15 e 17**). Questo potrebbe derivare dal fatto che tale subunità venga abbondantemente espressa tardivamente durante lo sviluppo embrionale del cuore e che non sia ancora sufficientemente presente da essere rilevata a questo stadio di differenziamento. Questa ipotesi è supportata da uno studio che ha messo in evidenza come, nel topo, durante lo sviluppo embrionale del cuore ci sia un cambiamento nei livelli di mRNA delle varie isoforme HCN. Infatti durante gli stadi precoci dello sviluppo, i miociti ventricolari di topo presentano un'elevata espressione dell'mRNA di HCN4 e HCN1, e scarse quantità di HCN2; mentre in stadi più tardivi HCN2 aumenta, a scapito sia di HCN1 che di HCN4, diventando l'isoforma predominante (Yasui *et al.*, 2001). Per quanto riguarda l'isoforma HCN3, essa è stata rilevata raramente solo in cellule non esprimenti caveolina 3 (**Fig.15 e 17**). Questa isoforma è stata poco caratterizzata e non si conosce molto riguardo alla sua espressione/funzione a livello cardiaco, infatti, solo recentemente, è stata dimostrata la sua presenza nel ventricolo di topo (Mistrik *et al.*, 2005).

Un substrato autoritmico con caratteristiche tipiche del tessuto pacemaker deve possedere, oltre alle strutture molecolari preposte alla generazione di potenziali d'azione spontanei, anche l'apparato molecolare necessario per la modulazione autonoma della frequenza. Il nodo senoatriale è particolarmente innervato dalla branca simpatica e parasimpatica del sistema nervoso autonomo e, a livello cellulare, i miociti senoatriali sono particolarmente ricchi di recettori β -adrenergici (β_1 e β_2) e muscarinici M2 (Brodde *et al.*, 1982; Rodefelt *et al.*, 1996; Brodde *et al.*, 2001). L'elevata densità di questi recettori assicura una risposta rapida alla stimolazione autonoma. Questo processo di modulazione è basato sulle variazioni intracellulari del secondo messaggero AMP ciclico che agisce direttamente sui canali pacemaker aumentando la loro probabilità di apertura (DiFrancesco and Tortora, 1991; DiFrancesco and Mangoni, 1994). I dati di immunofluorescenza forniscono la prima evidenza dell'espressione dei recettori β -adrenergici e muscarinici nei miociti derivati dalle ESCs positivi per la caveolina 3 (**Fig.19**). In un lavoro recentemente pubblicato dal nostro laboratorio è stato dimostrato che nei miociti

senoatriali di coniglio, i recettori β_2 -adrenergici sono quelli maggiormente responsabili dell'aumento della frequenza di scarica dei potenziali d'azione, mentre l'attivazione dei recettori β_1 -adrenergici modula tale frequenza in misura minore (Barbuti *et al.*, 2007). Dai risultati ottenuti sui miociti derivati dalle ESCs sembra invece che il recettore β_2 -adrenergico sia espresso ad un livello più basso e solo in poche cellule. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alla diversità di specie oppure allo stadio precoce di sviluppo del sistema cellulare in esame. In ogni caso i dati mostrati sono in accordo con precedenti studi in cui si osserva che l'aumento della frequenza di contrazione spontanea degli EBs indotta da isoproterenolo (agonista adrenergico) diminuisce dopo la perfusione di un antagonista selettivo dei recettori β_1 -adrenergici, mentre non cambia in seguito alla perfusione di un agonista inverso specifico per i recettori β_2 -adrenergici (Ali *et al.*, 2004). Questi dati confermano comunque la presenza, nei miociti derivati da cellule ES, dell'apparato trasduzionale che fisiologicamente media la modulazione fine della frequenza cardiaca.

I nostri risultati indicano quindi che le cellule ES, già a stadi precoci, differenziano in cardiomiociti tra i quali è presente una sottopopolazione cellulare con caratteristiche molecolari tipiche delle cellule pacemaker cardiache, come la presenza di canali ionici richiesti per l'attività pacemaker e pathway biochimici necessari per la modulazione della frequenza mediata da neurotrasmettitori.

Dopo aver dimostrato la presenza di cardiomiociti con fenotipo pacemaker all'interno degli EBs, il passo successivo rappresenta l'isolamento di questa popolazione cellulare. Come ci si potrebbe aspettare, il numero delle cellule *pacemaker-like* all'interno di un singolo EB è molto basso, così come, nel cuore, il tessuto di conduzione rappresenta una piccola percentuale della massa cardiaca. L'isolamento dei cardiomiociti pacemaker è reso quindi difficile sia dalla bassa resa cellulare sia dalla mancanza di antigeni extracellulari specifici ed esclusivi di queste cellule. Inoltre le prospettive di utilizzo clinico di un substrato cellulare derivato da cellule indifferenziate vengono limitate dalla difficoltà di ottenere una popolazione definitivamente differenziata e omogenea. La presenza di cellule staminali indifferenziate infatti potrebbe indurre la formazione di teratomi nell'ospite ricevente.

Per discriminare una popolazione di cellule differenziate verso il fenotipo di interesse si possono utilizzare due strategie. La prima prevede l'uso di geni reporter, come la GFP, attivati da promotori specifici del tessuto di interesse. Mentre la seconda utilizza marcatori specifici di membrana che possono essere riconosciuti da anticorpi specifici. Per quanto riguarda il primo approccio, in letteratura sono presenti alcuni esempi di identificazione e isolamento di cardiomiociti da mESCs ingegnerizzate. Alcune di queste strategie si basano per esempio sull'espressione della EGFP sotto il controllo del promotore di vari geni cardiaci quali la catena

pesante dell' α -miosina (α -MHC) (Kolossoff *et al.*, 2005), il peptide natriuretico atriale (ANP; Gassanov *et al.*, 2004) o del promotore del gene cGATA6 (chicken GATA6) e del transgene minK-lacZ (White and Claycomb, 2005).

Come già ricordato, a livello cardiaco, uno dei geni caratterizzanti la regione pacemaker, già dagli stadi precoci di differenziamento, è quello del canale pacemaker HCN4 (Garcia-Frigola *et al.*, 2003; Hoogaars *et al.*, 2004). Il canale HCN4 è quindi considerato marker specifico del tessuto di conduzione cardiaco. Per localizzare e successivamente isolare miociti pacemaker maturi derivati dal differenziamento di mESCs, il nostro laboratorio ha costruito il plasmide pHCN4-EGFP (**Fig.20**) con il quale sono state elettroporate le mESCs indifferenziate utilizzate in seguito per la formazione di EBs.

I dati di immunofluorescenza mostrati precedentemente (**Fig.26, 27 e 28**) confermano la presenza del canale HCN4 in cellule EGFP positive. Inoltre queste cellule esprimono anche marcatori cardiaci/muscolari come l' α -actinina sarcomerica, la caveolina 3 e la connessina 43 indicando il differenziamento di tali cellule verso il fenotipo di interesse. La coespressione di EGFP, del canale HCN4 e dei marcatori cardiaci/muscolari indica come il plasmide pHCN4-EGFP possa essere utilizzato come metodo per identificare i miociti pacemaker.

Tuttavia sono state osservate cellule EGFP positive prive della marcatura per HCN4 e viceversa. Questa aspecificità potrebbe dipendere sia dal processo di marcatura sia da meccanismi di controllo post-trascrizionale. La EGFP, essendo una proteina citoplasmatica, risente del processo di permeabilizzazione. Inoltre è noto in letteratura come la traduzione del trascritto dei canali HCN2 e HCN4 sia inibita dall'azione di microRNA (Xiao *et al.*, 2007). I microRNA sono piccole molecole di RNA a singolo filamento che legano la regione 3'UTR dell'mRNA bersaglio, bloccandone la traduzione; questo potrebbe spiegare l'assenza di HCN4 in cellule EGFP positive, che in quanto tali dovrebbero aver acceso il promotore. Inoltre la regione del promotore utilizzata nel plasmide rappresenta solo una piccola parte della sequenza che regola la trascrizione del gene HCN4 e potrebbe quindi non riprodurre fedelmente la complessa dinamica del sistema di regolazione trascrizionale.

Il limite principale di questa tecnica è la presenza di cellule EGFP positive al di fuori delle porzioni contrattili degli EBs. La localizzazione di queste cellule fa pensare che esse si siano differenziate verso un'altra linea cellulare diversa da quella cardiaca. Infatti l'espressione di HCN4 non è limitata solo a livello cardiaco ma è presente anche a livello del sistema nervoso. Esistono pubblicazioni che ne dimostrano la presenza in cellule del cervelletto, della corteccia cerebrale, della retina, dell'ippocampo e del talamo (Seifert *et al.*, 1999; Demontis *et al.*, 2002; Moosmang *et al.*, 2001). Va inoltre ricordato che l'EB è il modello riassuntivo e completo dello sviluppo embrionale. Ne deriva che esso dà sempre origine a tutti i tipi cellulari derivanti dai tre

foglietti embrionali. In uno studio recente (Morikawa *et al.*, 2009) è stato adottato un approccio simile al nostro per selezionare le cellule pacemaker-like all'interno di EBs. Le mESCs sono state ingegnerizzate con un plasmide in cui l'espressione della GFP è guidata dal promotore del gene HCN4. In questo caso il promotore usato da Morikawa e collaboratori comprende una regione molto più ampia rispetto a quella da noi considerata ed è stato inserito nelle cellule tramite ricombinazione omologa. Stranamente il 65% delle cellule GFP positive isolate non esibisce attività ritmica spontanea; questo, insieme all'evidenza che il marker neuronale nestina è stato rilevato in queste cellule anche se a bassi livelli, suggerisce che una frazione di cellule GFP positive potrebbe contenere cellule non cardiache.

Nonostante l'espressione di HCN4 sia caratteristica del tessuto di conduzione a livello cardiaco, la sua espressione in altri tessuti lo rende un marcatore non sufficientemente specifico da utilizzare in un sistema eterogeneo come quello rappresentato dagli EBs. Sfortunatamente ad oggi non è ancora stato identificato un marcatore di membrana che riconosca in maniera specifica i cardiomiociti in genere e a maggior ragione i cardiomiociti pacemaker. Recentemente però alcuni lavori hanno dimostrato che la proteina CD166 viene espressa in maniera specifica nel cuore in una ristretta finestra temporale sia durante lo sviluppo cardiaco di topo che durante il differenziamento di cellule staminali embrionali umane (Murakami *et al.*, 2007; Rust *et al.*, 2009).

Dato che nel lavoro di Murakami la popolazione di precursori cardiaci veniva isolata al giorno 8.5 dal sacco vitellino di topo, abbiamo deciso di analizzare gli EBs in un intervallo di tempo compreso tra il sesto e il decimo giorno di differenziamento (dal 6 al 7+3). I dati ottenuti confrontando le percentuali di cellule esprimenti il CD166 ed i livelli di espressione dell' α -actinina nelle cellule CD166 positive rispetto alle negative (specificità) mostrano chiaramente che col progredire del differenziamento aumenta la percentuale di cellule CD166+ mentre diminuisce la specificità per i cardiomiociti; in particolare il giorno 7+1 risulta essere quello in cui sia la specificità di espressione dell' α -actinina che la percentuale di cellule CD166+ sono elevate (**Fig.29**).

Dalle analisi al microscopio in luce trasmessa appare chiaro che le colture ottenute dalle due sottopopolazioni (CD166+ e CD166-) presentano delle nette differenze. Nella sottopopolazione CD166- si osserva infatti la presenza di grossi aggregati cellulari, a volte simili a veri e propri EBs, nei quali solo pochissime cellule mostrano segni di autoritmicità, mentre nella sottopopolazione CD166+ si assiste sempre alla formazione di un tappeto di cellule dotato di attività autoritmica indicando la presenza di cardiomiociti con fenotipo pacemaker. Le analisi di immunofluorescenza hanno dimostrato che circa il 60% delle cellule CD166+ sono cardiomiociti che presentano un apparato contrattile ben organizzato in sarcomeri, come è mostrato dalla

marcatura per l' α -actinina (**Fig.31**). In letteratura viene riportato che solo circa il 5% delle cellule all'interno degli EBs differenzia spontaneamente in cardiomiociti (Metzger *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 2000; Kolossov *et al.*, 2005). L'utilizzo di CD166 come marker risulta quindi essere un ottimo strumento di selezione in quanto ci permette di ottenere una popolazione cellulare arricchita di circa il 60% in miociti cardiaci. Inoltre, delle cellule positive per l' α -actinina, circa il 43% esprime il canale HCN4 (**Fig.32 e 33**). Se si confrontano questi dati con i risultati ottenuti da Morikawa (Morikawa *et al.*, 2009), in cui solo lo 0.9% delle cellule esprime HCN4 e di queste più della metà non presenta attività autoritmica, e se si tiene conto che le cellule senoatriali esprimono anche altre subunità dei canali HCN (in particolare HCN1 ed in misura molto minore HCN2), risulta chiaro l'enorme arricchimento in cellule pacemaker grazie al nostro protocollo di selezione. Dato che HCN4 è comunque espresso precocemente durante lo sviluppo del nodo senoatriale (Garcia-Frigola *et al.*, 2003; Hoogaars *et al.*, 2004), abbiamo valutato l'espressione di altri marcatori più tardivi per evidenziare la maturazione delle nostre cellule. A questo proposito le cellule CD166+ esprimono la caveolina 3 (**Fig.34**), l'isoforma muscolare di una proteina che compone le caveolae, di cui è nota l'interazione con i canali pacemaker nei miociti nativi del nodo senoatriale (Barbuti *et al.*, 2004; Barbuti *et al.*, 2007) e nelle cellule pacemaker-like derivate dal differenziamento delle ESCs a stadi tardivi di differenziamento (**Fig.14**; Barbuti *et al.*, 2009). Infine l'osservazione che la maggior parte delle cellule CD166+ risulta essere GFP-positiva conferma l'attivazione del promotore del gene HCN4 in queste cellule e così il loro fenotipo pacemaker.

In conclusione i nostri dati dimostrano che CD166 può essere utilizzato, in uno specifico stadio di differenziamento, come un antigene di superficie per selezionare una popolazione cellulare arricchita in cardiomiociti che presentano alcune caratteristiche tipiche delle cellule pacemaker senoatriali. Per questa ragione, la popolazione cellulare CD166+ possiede le caratteristiche che la rendono un substrato cellulare adatto per la creazione di un pacemaker biologico.

Nell'immediato futuro abbiamo intenzione di approfondire ulteriormente la caratterizzazione sia dal punto di vista funzionale che molecolare delle cellule derivanti dalle colture di CD166+ al fine di verificare l'effettiva presenza di tutte le caratteristiche tipiche delle cellule senoatriali native come la corrente I_f , la modulazione da parte di agonisti autonomici e l'espressione di fattori trascrizionali, proteine strutturali e canali ionici che le caratterizzano. Inoltre verranno condotti studi per escludere la teratogenicità di queste cellule e per verificare la loro capacità nel guidare i potenziali d'azione di miociti ventricolari. Lo scopo ultimo è quello di isolare un substrato autoritmico, da inserire in un'opportuna matrice biopolimerica che possa essere trapiantata in modelli animali per poter valutare l'effettiva funzionalità pacemaker.

La scelta di utilizzare cellule staminali embrionali murine rimane comunque penalizzante in una prospettiva clinica. Fondamentalmente si tratta di una scelta di metodo: risulta infatti necessario incrementare il bagaglio di conoscenze sul modello animale in modo da trasferire in futuro le nozioni acquisite in ambito umano.

Bibliografia

- DiFrancesco D, Ferroni A, Mazzanti M, Tromba C. Properties of the hyperpolarizing-activated current (I_f) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1986;377:61-88.
- Denyer JC, Brown HF. Rabbit sino-atrial node cells: isolation and electrophysiological properties. *J Physiol* 1990;428:405-24.
- Shi W, Wymore R, Yu H, Wu J, Wymore RT, Pan Z *et al.* Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 1999;85:e1-6.
- DiFrancesco D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 1981;314:359-76.
- Robinson RB, Yu H, Chang F, Cohen IS. Developmental change in the voltage-dependence of the pacemaker current, I_f , in rat ventricle cells. *Pflugers Arch* 1997;433:533-5.
- Cerbai E, Pino R, Sartiani L, Mugelli A. Influence of postnatal-development on I_f occurrence and properties in neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 1999;42:416-23.
- Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 1996;58:299-327.
- Halliwell JV, Adams PR. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res* 1982;250:71-92.
- Dekin MS. Inward rectification and its effects on the repetitive firing properties of bulbospinal neurons located in the ventral part of the nucleus tractus solitarius. *J Neurophysiol* 1993;70:590-601.
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9391-6.
- Demontis GC, Moroni A, Gravante B, Altomare C, Longoni B, Cervetto L *et al.* Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol* 2002;542:89-97.
- Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur J Biochem* 2001;268:1646-52.
- DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993;55:455-72.

- DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 1991;351:145-7.
- DiFrancesco D, Mangoni M. Modulation of single hyperpolarization-activated channels (I_f) by cAMP in the rabbit sino-atrial node. *J Physiol* 1994;474:473-82.
- DiFrancesco D, Ducouret P, Robinson RB. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 1989;243:669-71.
- Santoro B, Grant SG, Bartsch D, Kandel ER. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14815-20.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA *et al.* Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 1998;93:717-29.
- Gauss R, Seifert R, Kaupp BU. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 1998;393:583-7.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998;393:587-91.
- Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 2001;63:235-57.
- Biel M, Zong X, Ludwig A, Sautter A, Hofmann F. Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;135:151-71.
- Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12:206-12.
- Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A *et al.* C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 2001;276:29930-4.
- Ulens C, Tytgat J. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 2001;276:6069-72.
- Chen S, Wang J, Siegelbaum SA. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J Gen Physiol* 2001;117:491-504.
- Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanesi R, Pagliuca C, Viscomi C *et al.* Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 2003;549:347-59.
- Moosmang S, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biological Chemistry* 1999;380:975-80.
- Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, Ohmori H. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 1999;274:12835-9.

- Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 1999;18:2323-9.
- Mistrik P, Mader R, Michalakakis S, Weidinger M, Pfeifer A, Biel M. The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 2005;280:27056-61.
- Yasui K, Liu W, Opthof T, Kada K, Lee JK, Kamiya K et al. If current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. *Circ Res* 2001;88:536-42.
- Barbuti A, Gravante B, Riolfo M, Milanesi R, Terragni B, DiFrancesco D. Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ Res* 2004;94:1325-31.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-6.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:7634-8.
- Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP *et al.* Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-7.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
- Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991;48:173-82.
- Maltsev VA, Rohwedel J, Hescheler J, Wobus AM. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mechanisms of Development* 1993;44:41-50.
- Adan V, Crown LA. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome. *Am Fam Physician* 2003;67:1725-32.
- Edelberg JM, Aird WC, Rosenberg RD. Enhancement of murine cardiac chronotropy by the molecular transfer of the human beta2 adrenergic receptor cDNA. *J Clin Invest* 1998;101:337-43.
- Edelberg JM, Huang DT, Josephson ME, Rosenberg RD. Molecular enhancement of porcine cardiac chronotropy. *Heart* 2001;86:559-62.
- Miake J, Marban E, Nuss HB. Biological pacemaker created by gene transfer. *Nature* 2002;419:132-3.
- Qu J, Barbuti A, Protas L, Santoro B, Cohen IS, Robinson RB. HCN2 overexpression in newborn and adult ventricular myocytes: distinct effects on gating and excitability. *Circ Res* 2001;89:E8-14.

- Qu J, Plotnikov AN, Danilo P, Jr., Shlapakova I, Cohen IS, Robinson RB *et al.* Expression and function of a biological pacemaker in canine heart. *Circulation* 2003;107:1106-9.
- Plotnikov AN, Sosunov EA, Qu J, Shlapakova IN, Anyukhovskiy EP, Liu L *et al.* Biological pacemaker implanted in canine left bundle branch provides ventricular escape rhythms that have physiologically acceptable rates. *Circulation* 2004;109:506-12.
- Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, Potapova I, Zuckerman J, Walcott B *et al.* Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions. *J Physiol* 2004;555:617-26.
- Potapova I, Plotnikov A, Lu Z, Danilo P, Jr., Valiunas V, Qu J *et al.* Human mesenchymal stem cells as a gene delivery system to create cardiac pacemakers. *Circ Res* 2004;94:952-9.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985;87:27-45.
- Wobus AM, Kaomei G, Shan J, Wellner MC, Rohwedel J, Ji G *et al.* Retinoic acid accelerates embryonic stem cell-derived cardiac differentiation and enhances development of ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1525-39.
- Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A *et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001;108:407-14.
- Kehat I, Khimovich L, Caspi O, Gepstein A, Shofti R, Arbel G *et al.* Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004;22:1282-9.
- Xue T, Cho HC, Akar FG, Tsang SY, Jones SP, Marban E *et al.* Functional integration of electrically active cardiac derivatives from genetically engineered human embryonic stem cells with quiescent recipient ventricular cardiomyocytes: insights into the development of cell-based pacemakers. *Circulation* 2005;111:11-20.
- Rosen MR, Brink PR, Cohen IS, Robinson RB. Genes, stem cells and biological pacemakers. *Cardiovasc Res* 2004;64:12-23.
- Metzger JM, Lin WI, Samuelson LC. Transition in cardiac contractile sensitivity to calcium during the in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Biol.* 1994;126:701-711.
- Muller M, Fleischmann BK, Selbert S *et al.* Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells in vitro. *FASEB J* 2000;14:2540-2548.
- Kolosov E, Lu Z, Drobinskaya I, Gassanov N, Duan Y, Sauer H, Manzke O, Bloch W, Bohlen H, Hescheler J and Fleischmann BK. Identification and characterization of embryonic stem cell-derived pacemaker and atrial cardiomyocytes. *FASEB J* 2005;19:577-79.

- Morikawa K, Bahrudin U, Miake J, Igawa O, Kurata Y, Nakayama Y, Shirayoshi Y and Hisatome I. Identification, Isolation and Characterization of HCN4-Positive Pacemaking Cells Derived from Murine Embryonic Stem Cells during Cardiac Differentiation. *PACE* 2009;33:290-303.
- Hirata H, Murakami Y, Miyamoto Y, Tosaka M, Inoue K, Nagahashi A, Jakt LM, Asahara T, Iwata H, Sawa Y, Kawamata S. ALCAM (CD166) is a surface marker for early murine cardiomyocytes. *Cells Tissues Organs* 2006;184, 172–180.
- Murakami Y, Hirata H, Miyamoto Y, Nagahashi A, Sawa Y, Jakt M, Asahara T, Kawamata S. Isolation of cardiac cells from E8.5 yolk sac by ALCAM (CD166) expression. *Mechanisms of Development* 2007;124:830–839.
- Rust W, Balakrishnan T, Zweigerdt R. Cardiomyocyte enrichment from human embryonic stem cell cultures by selection of ALCAM surface expression. *Regen Med* 2009;4(2):1-13.
- Kuratomi S, Kuratomi A, Kuwahara K, Ishii TM, Nakao K, Saito Y, Takano M. NRSF regulates the developmental and hypertrophic changes of HCN4 transcription in rat cardiac myocytes. *Bioc And Biop Res Communications* 2007;353:67-73.
- Maltsev VA, Wobus AM, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994;75:233-44.
- Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM *et al.* Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1997;36:149-62.
- DiFrancesco D. Serious workings of the funny current. *Prog Biophys Mol Biol* 2006;90:13-25.
- Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, DiFrancesco D. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. *NIPS* 2002;17:32-7.
- Barbuti A, Terragni B, Brioschi C, DiFrancesco D. Localization of f-channels to caveolae mediates specific beta2-adrenergic receptor modulation of rate in sinoatrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42:71-8.
- Barbuti A, Crespi A, Capilupo D, Mazzocchi N, Baruscotti M, DiFrancesco D. Molecular composition and functional properties of f-channels in murine embryonic stem cell-derived pacemaker cells. *J Mol Cell Cardiol* 2009;46:343-351.
- Marionneau C, Couette B, Liu J, Li H, Mangoni ME, Nargeot J, et al. Specific pattern of ionic channel gene expression associated with pacemaker activity in the mouse heart. *J Physiol* 2005;562:223-34.
- Liu J, Dobrzynski H, Yanni J, Boyett MR, Lei M. Organisation of the mouse sinoatrial node: structure and expression of HCN channels. *Cardiovasc Res* 2007;73:729-38.
- Tellez JO, Dobrzynski H, Greener ID, Graham GM, Laing E, Honjo H, et al. Differential expression of ion channel transcripts in atrial muscle and sinoatrial node in rabbit. *Circ Res* 2006;99:1384-93.

- Yamamoto M, Dobrzynski H, Tellez J, Niwa R, Billeter R, Honjo H, et al. Extended atrial conduction system characterised by the expression of the HCN4 channel and connexin45. *Cardiovasc Res* 2006;72:271-81.
- Maria M. Kreuzberg, Klaus Willecke, and Feliksas F. Bukauskas. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16:266-72.
- Qu Y, Whitaker GM, Hove-Madsen L, Tibbits GF, Accili EA. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated 'HCN' channels confer regular and faster rhythmicity to beating mouse embryonic stem cells. *J Physiol* 2007.
- Yanagi K, Takano M, Narazaki G, Uosaki H, Hoshino T, Ishii T, Misaki T, Yamashita JK. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels and T-type calcium channels confer automaticity of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells* 2007;25(11):2712-9.
- Chandler NJ, Greener ID, Tellez JO, Inada S, Musa H, Molenaar P, DiFrancesco D, Baruscotti M, Longhi R, Anderson RH, Billeter R, Sharma V, Sigg DC, Boyett MR, Dobrzynski H. Molecular architecture of the human sinus node - insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 2009;119:1562-1575.
- Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A and DiFrancesco D. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I_f . *J Biol Chem* 2001;276(31):29233-29241.
- Brioschi C, Micheloni S, Tellez JO, Pisoni G, Longhi R, Moroni P, Billeter R, Barbuti A, Dobrzynski H, Boyett MR, DiFrancesco D, Baruscotti M. Distribution of the pacemaker HCN4 channel mRNA and protein in the rabbit sinoatrial node. *J Mol Cell Cardiol* 2009;47(2):221-27.
- Stieber J, Herrman S, Feil S, Loster J, Robert F, Biel M, Hofmann F and Ludwig A. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *PNAS* 2003;100(25):15235-40.
- Milanesi R, Baruscotti M, Gneccchi-Ruscone T and DiFrancesco D. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N Engl J Med* 2006;354(2):151-57.
- Ueda K, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M and Kimura A. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem* 2004;279(26):27194-98.
- van Kempen M, van Ginneken A, de G, I, Mutsaers N, Opthof T, Jongsma H *et al.* Expression of the electrophysiological system during murine embryonic stem cell cardiac differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:263-70.
- White SM, Claycomb WC. Embryonic stem cells form an organized, functional cardiac conduction system in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H670-H679.

-
- Brodde OE, Leifert FJ, Krehl HJ. Coexistence of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the rabbit heart: quantitative analysis of the regional distribution by (-)-3H-dihydroalprenolol binding. *J Cardiovasc Pharmacol* 1982;4:34-43.
 - Rodefeld MD, Beau SL, Schuessler RB, Boineau JP, Saffitz JE. Beta-adrenergic and muscarinic cholinergic receptor densities in the human sinoatrial node: identification of a high beta 2-adrenergic receptor density. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;7:1039-49.
 - Brodde OE, Bruck H, Leineweber K, Seyfarth T. Presence, distribution and physiological function of adrenergic and muscarinic receptor subtypes in the human heart. [Review] [133 refs]. *Basic Res Cardiol* 2001;96:528-38.
 - Ali NN, Xu X, Brito-Martins M, Poole-Wilson PA, Harding SE, Fuller SJ. Betaadrenoceptor subtype dependence of chronotropy in mouse embryonic stem cellderived cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 2004;99:382-91.
 - Gassanov N, Er F, Zagidullin N, Hoppe UC. Endothelin induces differentiation of ANP-EGFP expressing embryonic stem cells towards a pacemaker phenotype. *FASEB J*. 2004;18(14):1710-2.
 - Garcia-Frigola C, Shi Y, Evans SM. Expression of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel HCN4 during mouse heart development. *Gene Expr Patterns* 2003;3:777-83.
 - Hoogaars WM, Tessari A, Moorman AF, de Boer PA, Hagoort J, Soufan AT *et al*. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. *Cardiovasc Res* 2004;62:489-99.
 - Xiao J, Yang B, Lin H, Lu Y, Luo X, Wang Z. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *J of Cellular Physiol* 2007;212:285-92.